

UNIVERSITE DE LA REUNION

THESE

Présentée pour obtenir le grade de **Docteur**

Spécialité : Génie des Procédés

DECONTAMINATION DE PEAUX DE VOLAILLES PAR UTILISATION D'UNE SOLUTION D'ACIDE LACTIQUE ET DE VAPEUR D'EAU. EFFET DES TRAITEMENTS SEULS OU COMBINES

par

Jean-Yves LECOMPTE

Ingénieur de l'Institut Agro-Alimentaire de Lille

Soutenue le 1^{er} juillet 2008 devant la commission d'examen composée de :

Sabine GALINDO, Maître de conférences, Université de Montpellier II, HDR	Rapporteur
Joseph CULIOLI, Directeur de recherches, INRA, Theix	Rapporteur
Laurent DUFOSSE, Professeur, Université de La Réunion	Examineur
Samira SARTER, Chercheur, CIRAD, Madagascar	Examineur
Alain KONJOYAN, Directeur de Recherche, INRA, Theix (codirecteur de thèse)	Examineur
Antoine COLLIGNAN, Professeur, Montpellier SupAgro (directeur de thèse)	Examineur
François GAUVRIT, Directeur général de Crête d'Or Entreprise	Examineur

Cette thèse, réalisée au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) et à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) a bénéficié du soutien de la Région Réunion et du Fonds Social Européen (FSE).



Fonds social européen

Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse, Antoine Collignan et Alain Kondjoyan, pour leur soutien, leurs conseils et pour tout ce qu'ils m'ont appris sur le métier de chercheur.

Je remercie également Samira Sarter et Eric Cardinale pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté au cours de ce travail.

Merci également à tous mes collègues du CIRAD et de l'INRA, Nelly Bourdin qui a réussi à monter le laboratoire de microbiologie, Aurélie Pedarrieu qui a pris la relève et dont l'aide a été précieuse lors des essais, Adeline Vion et Jérôme Hoareau pour leur participation et leur acharnement à refaire les manip jusqu'à ce que tout fonctionne (ou presque), Stéphane Portanguen pour son aide et sa connaissance du premier pilote, Denis Gounelle pour la réalisation du second, Elodie Arnaud pour son accompagnement et à Jérôme Minier pour son caractère.

Merci encore à tous mes amis de La Réunion, pour avoir rendu cette expérience aussi agréable, et m'avoir permis de penser à autre chose qu'à la mauvaise volonté des bactéries durant nos week-ends et nos soirées relaxo-gastronomico-ludo-sportifs.

Je dédie cet ouvrage à mes parents, qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici, et à Virginie, qui m'a soutenu et encouragé ces dix dernières années.

Table des Matières

Introduction.....	1
Bibliographie	7
I. Contamination de surfaces des volailles.....	8
I.1. Les microorganismes pathogènes	8
I.2. Fixation des bactéries à la surface des volailles	10
I.3. Niveaux de contamination et normes en vigueur	12
II. Traitements chimiques de surface pour la décontamination des viandes.....	14
II.1. Composés utilisés pour décontaminer les viandes et autres produits carnés	14
II.2. Utilisation de composés acides.....	17
II.2.1 Mécanisme d'action	17
II.2.2 Facteurs susceptibles de modifier l'efficacité des traitements par des solutions d'acides organiques	19
II.2.3 Législation en vigueur.....	24
II.3. Effets de rémanence du traitement	26
II.4. Effets non souhaités.....	28
II.4.1 Apparition de résistances bactériennes	28
II.4.2 Altération des propriétés sensorielles.....	30
III. Traitements thermiques de décontamination.....	32
III.1. De la thermo-inactivation en milieu liquide à celle des carcasses	32
III.2. Traitements de décontamination par l'eau chaude.....	37
III.3. Traitements par l'air chaud et la vapeur.....	39
III.3.1 Air chaud.....	39

III.3.2	Traitement par la vapeur - température de surface inférieures ou égales à 100°C	41
III.3.3	Traitement par la vapeur - température de surface supérieure à 100°C.....	45
IV.	Réponse des bactéries aux traitements de décontamination	50
IV.1.	Réponse générale au stress.....	50
IV.2.	Réponse des bactéries à un traitement acide.....	51
IV.3.	Réponse des bactéries à un traitement thermique	54
IV.4.	Combinaison de stress	55
Matériel et méthodes	59
I.	Introduction.....	59
II.	Méthodes d'inoculation	60
II.1.	Choix des peaux utilisées	60
II.1.1	Origine et préparation des peaux congelées.....	61
II.1.2	Origine et préparation des peaux fraîches.....	61
II.1.3	Souches bactériennes utilisées.....	61
II.2.	Préparation de la solution d'inoculation	64
II.3.	Dispositifs d'inoculation.....	65
II.3.1	Dispositif utilisé au CIRAD-Réunion.....	66
II.3.2	Dispositif utilisé à l'INRA de Theix	67
III.	Dispositif de traitement acide.....	67
IV.	Traitement thermique.....	68
IV.1.	INRA.....	68
IV.2.	Dispositif utilisé au CIRAD-Réunion	70
V.	Méthodes de dénombrement des microorganismes	71
V.1.	Protocole appliqué à l'INRA	72

V.2.	Protocole appliqué au CIRAD	72
V.3.	Réductions décimales et analyse statistique	73
VI.	Détermination de la teneur résiduelle en acide lactique	74
VI.1.	Extraction de l'acide lactique	74
VI.2.	Dosage par HPLC ionique	75
VII.	Effet des traitements sur les propriétés organoleptiques des produits	75
VII.1.	Évaluation de l'effet des traitements thermiques sur la peau	75
VII.2.	Analyse sensorielle	76
	Résultats et discussion	77
I.	Traitement thermique.....	78
I.1.	Stratégie expérimentale.....	78
I.2.	Température de surface du produit	78
I.2.1	Dispositif de l'INRA de Theix.....	78
I.2.2	Pilote du CIRAD-Réunion	79
I.3.	Effets des traitements sur <i>Listeria innocua</i>	80
I.4.	Effets des traitements sur <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	86
II.	Traitements acides	86
II.1.	Décontamination acide de <i>Listeria innocua</i>	86
II.1.1	Réduction immédiate de la population après traitement.....	86
II.1.2	Évolution cinétique des populations de <i>Listeria innocua</i> inoculées seules ou en mélange au cours du stockage	90
II.2.	Décontamination acide de <i>Salmonella</i> inoculées en mélange.....	94
III.	Traitements combinés.....	95
III.1.	Effet de traitements combinés sur <i>Listeria innocua</i>	95
III.2.	Effet d'un traitement combiné sur <i>Salmonella</i> Enteritidis	97

IV. Impact des traitements sur les qualités organoleptiques du produit.....	98
IV.1. Teneurs résiduelles en acide lactique	98
IV.2. Évaluation des effets des traitements thermiques sur la peau	100
IV.3. Analyse sensorielle	100
Conclusion	102
Références bibliographiques.....	108
Glossaire	119
Table des illustrations	121
Liste des tableaux.....	124
Annexe. Code source de la macro « MPN.xla »	126

Introduction

A l'heure actuelle, la viande de volaille constitue la deuxième source de viande consommée dans le monde, derrière les porcins et devant les bovins et les ovins, avec une moyenne par habitant en 2004 de 12 kg dans le monde et 23 kg en Union Européenne et en France. Malgré les progrès réalisés au niveau des systèmes d'élevage et les règles d'hygiène mises en œuvre au sein des abattoirs et des usines de traitement, les carcasses de volailles restent fortement chargées en bactéries. Parmi ces bactéries, des bactéries pathogènes appartenant aux genres *Listeria*, *Salmonella* et *Campylobacter*, se retrouvent fréquemment et sont responsables en France et plus largement dans le monde d'un grand nombre d'infections alimentaires et de décès.

Les premiers travaux portant sur la décontamination de carcasses de volailles remontent aux années 70. Ce champ de travail connaît un regain d'intérêt depuis les années 90 en raison du durcissement des normes sanitaires en vigueur et de l'exigence croissante des consommateurs pour des produits à la fois plus frais, « naturels » (peu transformés), présentant une bonne durée de conservation et, de façon générale plus sûrs. Les crises sanitaires récentes (encéphalopathie spongiforme bovine, influenza aviaire) n'ont fait qu'accentuer l'importance accordée par les consommateurs aux côtés « naturels » et « sûrs » des aliments.

Si la décontamination des volailles est admise par la législation aux Etats-Unis, où l'utilisation de solutions de chlore pour « désinfecter » les carcasses fait partie des opérations de routine, il n'en va pas de même dans les pays de l'Union Européenne, et en particulier la France, où les autorités sanitaires considèrent plutôt que la diminution de la prévalence des bactéries pathogènes doit être obtenue par une modification des pratiques d'élevage en amont de l'abattoir. En effet, ces autorités pensent qu'un traitement de décontamination

des carcasses risquerait de dissuader les éleveurs d'accomplir les efforts nécessaires pour mettre en place et maintenir les règles d'hygiène souvent contraignantes au niveau de leurs élevages. Cette approche, qui se démarque clairement de la réglementation américaine, a pour conséquence l'interdiction d'entrée sur le territoire européen de carcasses de volailles provenant de pays utilisant des traitements chimiques de décontamination tels que les traitements au chlore. Une telle interdiction ne se limite pas à une simple mesure protectionniste, mais répond à de réelles incertitudes sur la présence de dérivés à risque (dérivés chlorés cancérigènes par exemple) à la surface des produits ainsi traités.

Mais cette position est susceptible de s'assouplir dans un avenir proche. En effet, les règles d'hygiène appliquées dans les élevages et qui sont entrées dans les mœurs ne suffisent pas à garantir l'absence totale de pathogènes sur les carcasses et la marge de progrès reste ténue. En effet, la source principale de contamination, et la plus difficile à maîtriser, se situe au niveau de la peau. Lors de la vie de l'animal, celle-ci se trouve en contact permanent avec les souillures. De plus, elle présente de nombreuses irrégularités (crevasses, follicules) au sein desquelles se fixent les bactéries. A l'abattoir, ces flores de surface se propagent à l'intérieur des muscles (normalement stériles) du fait des intercontaminations liées aux découpes successives. Là aussi, l'application de mesures d'hygiène strictes et de méthodes d'analyse des risques (HACCP) a permis de diminuer la prévalence des bactéries pathogènes dans les produits vendus au consommateur. Mais ces mesures trouvent rapidement leurs limites. La contamination de la surface des carcasses devrait poser un problème de plus en plus aigu pour la santé humaine parce que la consommation de viande de volaille tend à augmenter dans le monde et que les carcasses sont de plus en plus souvent découpées et transformées avant d'être commercialisées. Pour couronner le tout, il a été montré que des microorganismes pathogènes, notamment les Salmonelles, pouvaient résister à certaines cuissons domestiques.

La filière avicole européenne est de plus confrontée à court terme au renforcement des normes bactériologiques, auxquelles elle ne sait pas répondre. De ce fait, la pression américaine et le lobbying fort de l'industrie chimique en faveur de l'utilisation de composés déjà utilisés outre atlantique risquent d'être difficiles à contrer en l'absence d'arguments scientifiques solides ou de méthodes de décontamination alternatives efficaces.

Dans les pays en voie de développement, les normes bactériologiques sont généralement moins sévères et leur mise en œuvre plus souple, mais avec l'augmentation globale du niveau de vie et l'urbanisation galopante, la distance entre producteurs et consommateurs augmente, amplifiant ainsi les risques liés à une mauvaise qualité sanitaire des volailles et aux ruptures de la chaîne du froid. Par ailleurs, en climat tropical, les risques de contamination des élevages sont accrus. Le problème de la contamination des carcasses est donc d'autant plus important, et toute technique simple et économique permettant de décontaminer efficacement les carcasses permettrait de diminuer énormément les infections alimentaires.

La Réunion, terrain de cette étude présente un contexte particulier. En effet, les normes sanitaires européennes s'appliquent à cette île dont les conditions tropicales accentuent les problèmes de contamination des systèmes d'élevage de volailles. Les éleveurs sont donc contraints d'effectuer des efforts souvent plus importants que ceux de leurs collègues de métropole pour parvenir à un même résultat, et les conséquences de ruptures de la chaîne du froid après la sortie des abattoirs sont plus graves du fait des conditions d'hygrométrie et de température locales. Les risques de contaminations en provenance de la filière volaille sont augmentés par le fait que cette viande reste la plus consommée à La Réunion, avec 34 kg par habitant et par an, alors qu'elle n'arrive qu'en deuxième position en Métropole. Cette consommation particulière est notamment liée aux interdits religieux qui concernent les viandes de porc et de bœuf chez les populations de confession musulmane et tamoule de l'île. La production locale est majoritairement constituée par du poulet de chair, et subit la concurrence des importations de produits découpés congelés en particulier des cuisses de poulet qui proviennent de la CEE ou du Brésil et qui représentent 35% de la viande de volaille consommée à La Réunion. Cette concurrence a poussé la filière avicole à proposer des produits « pays » de qualité. D'autre part, la demande locale se rapproche progressivement de la demande métropolitaine, et s'oriente de plus en plus vers des produits élaborés, notamment de charcuterie de volailles. La filière avicole réunionnaise est donc fortement demandeuse d'innovations dans ce secteur et le CIRAD y appuie cette filière depuis plus de 7 ans par le biais d'actions de recherche et développement.

Même si de nombreuses études ont été consacrées à la décontamination des produits alimentaires, les résultats de la littérature restent souvent contradictoires quand à l'efficacité réelles des traitements. C'est pour avancer sur cette question que l'INRA et le CIRAD ont initié des travaux sur deux techniques complémentaires de décontamination de surface de volailles, a priori efficaces et sans risque pour la santé humaine, l'une par voie thermique à l'INRA et l'autre par voie chimique au CIRAD. Le traitement thermique, qui consiste en l'utilisation de jets de vapeur qui peuvent être surchauffés a été retenu du fait de son efficacité et de son image de traitement « biologique », auprès du consommateur par comparaison à d'autres techniques physiques telle que l'irradiation par exemple. Le traitement chimique quand à lui utilise des solutions d'acides lactiques car elles présentent un aspect plus « naturel » que les traitements chlorés utilisés dans plusieurs pays. Ainsi, en 2004, l'INRA et le CIRAD se sont associés pour co-diriger le présent travail de thèse en vue de bien caractériser l'efficacité de ces traitements dans de conditions suffisamment douces pour ne pas risquer de détériorer la qualité du produit frais, en les appliquant séparément d'une part, et de manière combinée d'autre part. L'application industrielle proprement dite de ces traitements sort du cadre de cette thèse et devra faire l'objet de recherches complémentaires. Néanmoins, ces travaux ont été menés en lien étroit avec notre partenaire industriel Crête d'OR Entreprise avec le souci constant de trouver des solutions technologiques appropriables par la profession (efficacité de traitement, facilité de mise en œuvre, viabilité économique, législation) et acceptée par le consommateur (acceptabilité du produit).

L'objectif de ce travail de thèse est ainsi d'approfondir les mécanismes responsables des décontaminations thermiques et chimiques et de définir un domaine de traitement permettant de réduire efficacement la charge bactérienne en surface des carcasses de volailles. Les traitements retenus ne devront pas modifier de manière significative les propriétés organoleptiques du produit, et laisser aussi peu de résidus que possible sur la carcasse. Ils devront également être de courte durée, afin de pouvoir s'appliquer sur des

lignes d'abattage présentant des cadences élevées et être les moins coûteux possibles en termes d'énergie et de consommables.

Ce manuscrit se décompose en trois chapitres. Tout d'abord, une étude bibliographique qui présente les principales caractéristiques des bactéries pathogènes cibles des opérations de décontamination des carcasses, leurs mécanismes de fixation sur la surface des volailles, et les niveaux de contaminations observés dans différents pays, comparés aux normes sanitaires en vigueur. Un état de l'art en matière de traitements chimiques et thermiques des pièces de viande est effectué. Les différents traitements chimiques classiques sont évoqués et les résultats obtenus avec les traitements par les acides organiques, particulièrement prometteurs, sont développés. En ce qui concerne les traitements thermiques, le chapitre suit l'évolution historique de la recherche en ce domaine, en commençant par la thermo-inactivation en milieu liquide, puis en s'intéressant aux traitements de décontamination par l'eau chaude, par l'air chaud et par la vapeur. Finalement, les mécanismes de réponse des microorganismes aux traitements sont décrits, ainsi que leurs conséquences potentielles sur la résistance des bactéries face aux traitements combinés chimiques et thermiques.

Les matériels et les méthodes utilisés lors de cette thèse sont présentés dans le deuxième chapitre. Les expériences ont eu lieu sur deux sites différents, à l'INRA de Clermont-Ferrand (Theix) d'une part, et au CIRAD de La Réunion d'autre part, avec des méthodologies parfois différentes. Un soin particulier est apporté à la justification du choix de la surface modèle sur laquelle sont testés les traitements et du matériel utilisé ou spécialement développé pour appliquer les traitements chimiques et thermiques. Une attention particulière est réservée à la détermination de la température qui existe réellement à la surface du produit et à la caractérisation de la variabilité des résultats microbiologiques. Le chapitre se termine par une présentation des méthodes utilisées pour mesurer les effets du traitement par l'acide lactique, la teneur résiduelle en acide dans le produit et ses propriétés organoleptiques.

Le troisième chapitre traite des résultats obtenus lors du traitement thermique d'une bactérie non pathogène, *Listeria innocua*, dont la réponse aux traitements est similaire à celle de *Listeria monocytogenes*, puis lors du traitement acide de *Listeria innocua* et d'un pathogène, *Salmonella* Enteritidis. L'effet du procédé est mesuré immédiatement après le traitement, mais aussi au cours d'une phase de stockage réfrigérée, simulant le parcours du produit avant sa vente au consommateur. Dans un troisième temps, l'efficacité de la combinaison des traitements acides et thermiques est étudiée, en cherchant à faire ressortir d'éventuelles synergies autorisant des niveaux de décontamination élevés avec des traitements les plus doux possible. Finalement, l'effet des traitements sur les caractéristiques organoleptiques et les teneurs résiduelles en acide est quantifié. Les résultats sont systématiquement discutés au regard de la littérature et des enseignements qu'ils apportent sur les mécanismes de décontamination.

Bibliographie

Malgré les efforts déployés par tous les acteurs de la filière volaille, des producteurs de poussins aux abattoirs industriels, les volailles vendues au consommateur présentent toujours une charge microbienne élevée. Parmi ces bactéries, certaines sont pathogènes et responsables d'un nombre non négligeable de décès. La plus grande partie de la charge bactérienne se trouve sur la peau dont est pourvue la carcasse lors de sa commercialisation. La recherche de moyens d'assurer une bonne qualité sanitaire des viandes de volaille a déjà fait l'objet d'un certain nombre d'études qui sont synthétisées dans ce chapitre. La première partie présente les pathogènes retrouvés sur les carcasses et découpes de volailles vendues au consommateur. Sont ensuite décrits les mécanismes à l'origine de la fixation des bactéries à la surface des volailles, les niveaux de contamination relevés par certaines études et les normes sanitaires en vigueur. La suite du chapitre analyse, au travers de la littérature, l'efficacité potentielle de différents traitements de décontamination. Les traitements chimiques sont tout d'abord développés en insistant particulièrement sur l'utilisation de composés acides, puis, les traitements thermiques sont présentés en reprenant les grandes catégories de traitements observées dans la littérature. Ce chapitre se termine par une présentation de l'état actuel des connaissances sur la réponse des bactéries aux stress générés par les traitements acides, thermiques et combinés.

I. Contamination de surfaces des volailles

Ce chapitre présente brièvement les bactéries pathogènes les plus fréquemment rencontrées sur les volailles et leurs risques pour l'homme. Il décrit ensuite les mécanismes de fixation des bactéries à la surface de la peau des volailles et l'efficacité de traitements de décontamination. Il rappelle finalement les normes sanitaires en vigueur dans l'Union Européenne, et les niveaux de contamination réellement mesurés dans différents pays du monde.

I.1. Les microorganismes pathogènes

Les microorganismes pathogènes les plus fréquemment rencontrés sur les volailles lors de leur achat par le consommateur sont les *Salmonella* spp. les *Campylobacter* spp. et *Listeria monocytogenes*. D'après l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp. ont été responsables de 71 à 85 % des infections bactériennes d'origine alimentaire (TIA) déclarées en France dans les années 1990 (Anonymous, 2003b). A elles deux, ces espèces bactériennes sont responsables en France de 40000 à 58000 cas d'infections alimentaires par an en moyenne et 100 à 500 morts par an (Tableau 1). Le nombre d'infections alimentaires causées par *Listeria monocytogenes* est beaucoup plus faible, avec 304 cas par an en moyenne, mais la proportion de décès qui lui est associée est beaucoup plus importante (76 décès/an).

Les infections par *Listeria monocytogenes* sont fréquemment asymptomatiques et 1 à 20% de la population générale est considéré porteur sain. Chez la femme enceinte, les infections se manifestent sous forme de symptôme pseudo-grippal, mais peuvent être à l'origine d'avortement, de mort *in utero*, de naissances prématurées ou d'infections néonatales (Anonymous, 2006c). Dans la population générale, entre 48 heures et 3 mois, les infections entraînent des méningites et des méningo-encéphalites et peuvent éventuellement laisser des séquelles neurologiques, la létalité atteignant 20 à 30%. Bien que la bactérie soit ubiquiste et très répandue dans l'environnement, la contamination se fait essentiellement par ingestion d'aliments contaminés, d'autant que la bactérie se développe bien aux températures rencontrées dans les réfrigérateurs domestiques, souvent plus proche de 8 à

10°C que des 4 à 6°C préconisés (Tableau 2). Les cas de listériose diagnostiqués font donc obligatoirement l'objet d'une déclaration, ce qui explique la précision des résultats de l'étude de l'InVS présentés dans le Tableau 1, contrairement aux autres bactéries responsables de TIA.

En ce qui concerne *Salmonella* spp. la majorité des infections relevées en France sont dues à *Salmonella* Enteritidis, et se traduit après 12 à 72 heures d'incubation par des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées accompagnées d'une fièvre à 39-40°C (Anonymous, 2002). Généralement, les symptômes disparaissent spontanément en 3 à 5 jours mais chez les sujets à risque (enfants, personnes âgées ou immunodéprimées), une insuffisance rénale causée par la déshydratation peut apparaître, ainsi que des bactériémies dues au caractère invasif de *Salmonella*. La bactérie est transmise principalement par ingestion d'aliments contaminés. Les animaux, et en particulier les volailles, ainsi qu'une proportion importante de la population humaine (5 à 30%) sont porteurs sains de *Salmonella* spp.

La plupart des *Campylobacter* spp. est peu pathogène et hébergée de manière asymptomatique par les animaux, principalement les oiseaux. La plupart des campylobactérioses est causée par *Campylobacter jejuni*, et se traduit après 1 à 10 jours d'incubation par une entérite aigue, des selles sanguinolentes, de la fièvre ainsi que des nausées et des vomissements (Anonymous, 2006a). Dans la majorité des cas, la maladie disparaît spontanément en une semaine. Dans environ un cas sur mille cependant, les infections à *Campylobacter jejuni* provoquent un syndrome de Guillain-Barré se traduisant par une paralysie plus ou moins complète et définitive, pouvant entraîner la mort.

Les principales caractéristiques de ces pathogènes sont résumées dans le Tableau 2.

I.2. Fixation des bactéries à la surface des volailles

Lors de l'arrivée des volailles à l'abattoir, si les animaux sont en bonne santé, la charge bactérienne est principalement localisée sur la peau et dans le système digestif. Si les conditions d'hygiène des ateliers d'abattage sont satisfaisantes, le transfert de la contamination du système digestif à la carcasse est limité. A la sortie de l'abattoir, la charge bactérienne est donc localisée majoritairement sur la peau et au niveau de la cavité abdominale de la carcasse.

Une importante population bactérienne reste fortement fixée à la peau même après un rinçage intensif. Ainsi, Hinton et Ingram, (2003) montrent qu'un rinçage par agitation forte durant 1 minute des peaux de poulet ne divise que par deux la quantité de bactéries à la surface de ces peaux (dénombrée par broyage de la peau), qu'il s'agisse de la flore totale, des entérobactéries ou des *Campylobacter* spp. Les nombreuses irrégularités dans lesquelles les bactéries peuvent se fixer au cours de la vie de l'animal (follicules plumeux, Figure 1, replis de la peau) expliqueraient cette difficulté à pouvoir détacher les bactéries de leur support. Mais l'importance des follicules plumeux comme zones dans lesquelles se fixent de grandes quantités de bactéries est sujette à discussion. En comparant les dénombrements de la microflore totale, *Escherichia coli* et *Campylobacter* spp. sur des carcasses de poulets génétiquement dépourvues de plumes (et donc de follicules plumeux) et sur des poulets témoins, Cason *et al.* (2004) n'ont pas observé de différence significative. Les bactéries disposeraient ainsi de suffisamment de sites de fixation à la surface de la peau pour que leur présence dans les follicules n'ait pas d'influence sur leur dénombrement.

Cependant, Kim *et al.* (1996) ont clairement mis en évidence par microscopie confocale que les follicules plumeux sont particulièrement colonisés par *Salmonella*. Les bactéries présentes dans les follicules plumeux sont potentiellement plus difficiles à atteindre par les traitements de décontamination que les autres bactéries (Kim *et al.* 1996). Par ailleurs, Capita *et al.* (2002c) démontrent que l'effet d'un traitement de décontamination par une solution de phosphate trisodique (TSP) est significativement plus faible sur la peau des

pattes de poulet que sur la peau de poitrine. Ce phénomène a été attribué à la plus grande quantité de crevasses et de follicules plumeux présents sur les pattes (Ellerbroek *et al.* 1996).

Par ailleurs, les bactéries naturellement présentes à la surface de la peau des volailles avant abattage ont eu le temps de former des biofilms susceptibles de leur fournir une protection accrue vis-à-vis du nettoyage et des traitements de décontamination ultérieurs. Les mécanismes de fixation des bactéries à des structures complexes comme la surface de la viande ou de la peau sont encore mal connus (Selgas *et al.* 1993). Cependant, la formation d'un biofilm a été décrite par plusieurs auteurs. Elle peut être divisée en quatre étapes (Chavant *et al.* 2004). Dans un premier temps, le substrat est conditionné par des macromolécules produites par les bactéries. Ensuite, les bactéries se fixent à la surface du substrat, initialement grâce à des liaisons faibles (interactions hydrophobes, acide-base de Lewis, Van der Waals), puis de manière irréversible, grâce à la production d'exopolymères permettant l'adhérence. Finalement, les microorganismes croissent, en formant des microcolonies et des agrégats conduisant à l'établissement du biofilm à proprement parler (Speranza *et al.* 2004). Sur des substrats simples (acier inoxydable, teflon), il a largement été démontré que les bactéries organisées en biofilms (bactéries « sessiles ») sont plus résistantes aux stress physiques (cisaillement, température) ou chimiques (variations de pH, de concentration en oxygène, radicaux libres, désinfectants, antibiotiques) que les bactéries dispersées (bactéries « planctoniques »). Ceci est d'autant plus marqué lorsque le biofilm est constitué par différentes espèces bactériennes (Carpentier et Chassaing, 2004). Ainsi, les cellules constituées en biofilms peuvent tolérer des concentrations en agents antimicrobiens dix à mille fois supérieures à celles qu'elles supporteraient en phase planctonique (Jefferson, 2004).

I.3. Niveaux de contamination et normes en vigueur

Les risques sanitaires causés par ces bactéries pathogènes ont incité le législateur à mettre en place des normes qui ont pour objectif d'assurer la sécurité du consommateur par rapport aux aliments qu'il ingère. La législation française dans ce domaine est en cours d'abrogation pour être remplacée par un règlement de la Communauté Européenne publié en 2007, résumé dans le Tableau 3 (Anonymous, 2007d).

Malgré les appels de la communauté médicale, il n'existe pas de critère sanitaire pour *Campylobacter* spp. Ce vide, probablement lié aux difficultés de détection de ce microorganisme et à l'absence actuelle de moyens de prophylaxie efficace au niveau des élevages ne tardera pas à être comblé.

En amont de l'abattoir, les normes sanitaires ont également été précisées, du moins pour *Salmonella* spp. dont le dépistage est obligatoire dans les élevages, les mesures de contrôle de la contamination pouvant aller jusqu'à la destruction de l'élevage au complet (Anonymous, 2007a; Anonymous, 2007b). Ces mesures drastiques sont justifiées par la facilité avec laquelle les contaminations bactériennes se répandent dans les élevages. Pour *Campylobacter* spp. par exemple, dans les élevages jugés contaminés, 90 à 100% des volailles sont porteuses de la bactérie (Allen *et al.* 2007).

Le durcissement des règles sanitaires en amont de l'abattoir et de l'hygiène au niveau des industries a progressivement permis d'améliorer la qualité sanitaire des volailles de manière significative. Ainsi, la prévalence de *Listeria monocytogenes* sur les volailles et les découpes de volailles à la sortie des abattoirs en France et en Belgique est passée de 32% en 1992 à 9% en 1995 et la proportion de carcasses jugées fortement contaminées (plus de 1 UFC·cm⁻²) est passée de 13% à 2% sur la même période (Uyttendaele *et al.* 1997).

Cependant, les efforts fournis par la filière ne permettent pas d'éliminer tous les risques de contamination. En Belgique, en 1996, la présence de *Salmonella* spp. était détectée sur 20 à

30% des carcasses et découpes de poulet vendues au consommateur (Uyttendaele *et al.* 1998). Dans les années 2000, *Listeria monocytogenes* était détectée dans 17 à 60% des carcasses de poulet cru vendues au Portugal (Mena *et al.* 2004) et dans 20 à 22% des carcasses sortant en 1999 des abattoirs de Finlande, Suède et Norvège (Gudbjornsdottir *et al.* 2004). En ce qui concerne *Campylobacter* spp. la proportion de carcasses de poulet contaminées vendues au Royaume-Uni, en Hollande et aux États-Unis est estimée à 80% (Corry et Atabay, 2001). Dans les pays du sud, la situation est au moins aussi inquiétante. Au Brésil, *Listeria monocytogenes* est détectée sur 14% des carcasses en sortie d'abattoir en 2003 (Barbalho *et al.* 2005), et en Afrique du Sud en 2003, 20% des carcasses de poulet vendues entières étaient contaminées par *Listeria monocytogenes*, 32% par *Campylobacter* spp. et 20 % par *Salmonella* spp. Au Sénégal, *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp. étaient détectés dans 32% et 26% respectivement des carcasses vendues aux consommateurs (Cardinale *et al.* 2003).

Si les informations sur la prévalence (nombre de volailles contaminées) ne manquent pas, très peu d'informations peuvent être trouvées sur le niveau de contamination de ces volailles. Les auteurs se limitent généralement à une analyse présence/absence telle qu'elle est imposée dans la législation (absence de *Salmonella* spp. dans 25 g de produit), et ne cherchent pas à connaître la charge microbienne que l'on peut trouver sur les carcasses contaminées. Pour *Listeria monocytogenes*, selon Uyttendaele *et al.* (1997), une carcasse est jugée fortement contaminée lorsqu'elle présente plus de 1 UFC·cm⁻² (16% des carcasses contaminées), et faiblement contaminée lorsqu'elle présente entre 0,1 et 1 UFC·cm⁻² (84% des carcasses contaminées). Les dénombrements étant effectués sur un broyage de 100 cm⁻² de peau et plus de 200 carcasses, ces résultats sont représentatifs mais ne s'appliquent qu'à des volailles élevées en France métropolitaine et en Belgique. En ce qui concerne *Campylobacter* spp. si la charge bactérienne atteint 5 à 6 log UFC·g⁻¹ dans le contenu cloacal, en sortie d'abattoir, les volailles contaminées présentent en moyenne 5,3 log UFC par carcasse. Cette concentration varie fortement selon les carcasses (1,3 à 8,0 log UFC par carcasse, Allen *et al.* 2007). Cependant, ces mesures n'ont été réalisées que sur 20 carcasses, et le dénombrement conduit selon un protocole particulier dans lequel 25 cm² de peau étaient broyés dans 300 ml du liquide de rinçage de la carcasse entière, et ne peuvent donc

nous fournir qu'un ordre de grandeur des concentrations bactériennes rencontrées à la surface de la peau sur des volailles élevées en climat tempéré (Royaume-Uni).

II. Traitements chimiques de surface pour la décontamination des viandes

Ce chapitre passe tout d'abord en revue les différents composés qui peuvent être utilisés pour décontaminer les viandes et les autres produits carnés en général, pour ensuite se focaliser sur les acides organiques et les carcasses de poulets qui feront l'objet du travail de thèse. L'effet de rémanence, caractéristique des traitements chimiques, est étudié et le chapitre se clôt sur les effets non souhaités liés à ces traitements.

II.1. Composés utilisés pour décontaminer les viandes et autres produits carnés

Dans le domaine de la décontamination bactérienne, les deux grandes classes de produits chimiques utilisés sont les antibiotiques et les antiseptiques.

Les antibiotiques agissent sur des sites spécifiques des structures bactériennes. Les principaux sites d'action sont la paroi bactérienne (e.g. l'inhibition de la synthèse de la paroi par les pénicillines), la membrane cytoplasmique, l'ADN bactérien (e.g. fixation de la mitomycine sur les brins d'ADN empêchant la réplication) et les protéines cellulaires (e.g. fixation de la streptomycine sur les ribosomes bloquant la traduction de l'ARNm).

Les antiseptiques, quant à eux, ont une action moins spécifique. Ils agissent principalement en perturbant la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique (tensioactifs, bases) et en dénaturant les protéines structurales et enzymatiques (halogénés, alcools, oxydants, acides).

Les produits carnés constituent un milieu privilégié, pour le développement des bactéries pathogènes qui sont issues majoritairement de la peau et du tube digestif. Leur stabilisation

s'avère être une nécessité lorsque les produits ne sont pas consommés immédiatement. Différents traitements peuvent être combinés afin de garantir la bonne qualité sanitaire. L'exemple du saucisson est éloquent puisqu'il contient des nitrites qui présentent une activité antiseptique. Il est salé et séché de manière à abaisser son activité en eau et subit une fermentation produisant de l'acide lactique (antiseptique) et des bactériocines (activité antimicrobienne). Mais ces traitements induisent une évolution des caractéristiques organoleptiques du produit au cours de sa transformation qui le démarquent ainsi du produit frais. Aussi, dans la suite de ce chapitre, nous nous limiterons aux traitements chimiques visant à améliorer et à préserver la qualité sanitaire du produit carné frais.

Une synthèse de l'efficacité de différents produits chimiques utilisés pour la décontamination de surfaces de volaille est présentée dans le Tableau 4.

Globalement, l'efficacité des traitements à l'acide lactique (concentration de 1 à 4%) ou au TSP (concentration de 1 à 12%) sur de la peau de poulet sont du même ordre de grandeur, avec des réductions de 1 à 2 log des *Listeria monocytogenes*, 1 log des *Salmonella* spp. et 0,3 à 0,6 log concernant la flore totale (Goncalves *et al.* 2005; Hwang et Beuchat, 1994; Okolocha et Ellerbroek, 2005).

En ce qui concerne d'autres produits chimiques, les résultats sont très variables. Ainsi, des traitements par des solutions d'acétate de sodium à 0,4%, de lactate de sodium à 2,5%, d'acide trichloroisocyanurique ou d'hypochlorite de calcium à 100 mg·l⁻¹, permettent d'atteindre des réductions de l'ordre de 4 log (Goncalves *et al.* 2005) sur la surface de muscle de poulet nu. Mais le substrat utilisé n'est pas identique (peau de poulet et muscle nu), aussi est-il difficile de conclure quant à l'effet propre du produit chimique et l'effet de la matrice carnée. Ce dernier point sera précisé dans le chapitre II.2.2.

Une solution de pyrophosphate acide de sodium, en revanche, n'a aucun effet significatif, tant sur *Listeria monocytogenes* que sur *Salmonella* spp. Des solutions de tripolyphosphate de sodium, de monophosphate de sodium, d'hexamétaphosphate de sodium à 10% et de NaOH à 0,05% ont des efficacités variables selon les espèces bactériennes considérées, avec

des réductions de l'ordre de 0,1 à 0,4 log sur *Salmonella* spp. et 0,3 à 0,7 pour *Listeria monocytogenes* (Hwang et Beuchat, 1994). Le phosphate tripotassique (K_3PO_4) ou l'oléate de potassium réduisent significativement les Entérobactéries et les *Campylobacter* (réduction respectivement de 3 et 2 log respectivement), mais la réduction de la flore totale et des entérocoques, bien que statistiquement significative, est très inférieure (0,5 log environ, Hinton et Ingram, 2003).

Les produits chimiques les plus fréquemment mentionnés dans la littérature sont les acides et les composés alcalins.

Parmi les composés alcalins, le plus étudié pour la décontamination de surfaces de volailles est le triphosphate de sodium (TSP). Son utilisation dans les abattoirs de volaille a été autorisée en France pour des concentrations allant jusqu'à 12%, avant d'être interdit en 1998 (Anonymous, 1999; Anonymous, 2003a). Ses mécanismes d'action sont généralisables à tout autre composé alcalin.

Le triphosphate de sodium (TSP) agit de trois manières différentes sur la flore de surface. Tout d'abord, l'effet détergent des solutions de TSP permet d'éliminer la fine couche lipidique à la surface de la peau (Giese, 1992), entraînant l'élimination des bactéries qui y sont fixées. Deuxièmement, ce même effet détergent supprime la protection des bactéries logées dans les follicules. Troisièmement, le TSP déstructure la membrane lipidique des bactéries. Ce phénomène expliquerait la plus grande sensibilité aux traitements alcalins des bactéries Gram négatives du fait des différences de structure de la paroi cellulaire entre bactéries Gram positives et Gram négatives. Les études sur la sensibilité des bactéries Gram positives et Gram-négatives aux polyphosphates sont cependant contradictoires. Pour Lee *et al.* (1994b), les bactéries Gram positives (*Listeria monocytogenes*) sont généralement plus sensibles que les bactéries Gram négatives alors que pour Corry et Mead, (1996) ce sont les bactéries Gram négatives, telles que *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp. et *Pseudomonas* spp. qui sont les plus sensibles. Capita *et al.* (2002b) concluent néanmoins que le TSP est plus actif sur les pathogènes Gram négatifs (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*) que sur

les pathogènes Gram positifs (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). Enfin, la force ionique et le pH élevés du milieu provoquent une autolyse entraînant une fuite des constituants de la cellule bactérienne observée par Lee *et al.* (1994b). Cette autolyse n'a été observée qu'en milieu nutritif, mais il est probable que le même mécanisme agisse en conditions réelles, malgré l'effet tampon des constituants de la peau.

La législation française interdisant explicitement l'utilisation de TSP pour la décontamination des volailles, ce travail de thèse s'est concentré sur une autre catégorie de produits chimiques, les acides organiques, dont les effets vont être détaillés dans le chapitre qui suit.

II.2. Utilisation de composés acides

Les acides organiques sont particulièrement intéressants pour la décontamination de surfaces des produits carnés. Certains d'entre eux permettent d'obtenir des décontaminations non négligeables et sont autorisés dans l'alimentation humaine. De plus, ils présentent un effet de rémanence extrêmement intéressant et peu d'effets indésirables (modification importantes de l'aspect des produits, formation de dérivés dangereux). Cependant, leurs mécanismes d'action sur les cellules bactériennes ne sont toujours pas pleinement élucidés et les nombreux facteurs susceptibles de modifier leur efficacité lors des traitements de décontamination en conditions « réelles » compliquent le choix d'un acide particulier et rendent difficile la définition des conditions opératoires les plus efficaces.

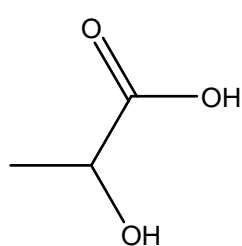
II.2.1 Mécanisme d'action

Les mécanismes d'action précis des acides organiques sont encore mal connus. Il est cependant démontré que l'action des acides organiques dépend du pH, du degré de dissociation de l'acide et du type d'acide utilisé (Ingram *et al.* 1956).

L'activité antimicrobienne des acides organiques est principalement liée à l'abaissement de pH. Plus le pH est faible, plus l'action est importante. Le degré de dissociation de l'acide est également un facteur important, les acides faibles non dissociés étant 10 à 600 fois plus

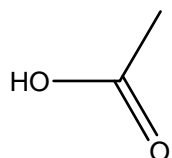
efficaces pour inhiber et détruire les microorganismes que les formes dissociées (Eklund, 1983), du moins lorsque les essais sont réalisés dans du bouillon nutritif. En milieux aqueux, les acides organiques se présentent principalement sous forme non dissociée. Aussi, à pH égal, ils présentent une activité antimicrobienne supérieure à celle des acides inorganiques, qui sont quant à eux totalement dissociés. Tamponner les acides en ajoutant leur sel soluble augmente leur efficacité, un nombre plus important de molécules non dissociées étant présent. Cependant, dans les mêmes conditions de pH et de degré de dissociation, des différences dans l'activité antimicrobienne des acides organiques peuvent apparaître (de Koos, 1992) du fait de la nature de l'anion (Smulders, 1995). Selon Brul et Coote (1999), les acides organiques traversent la membrane cellulaire sous forme non dissociée. Une fois à l'intérieur de la cellule, le pH intracellulaire plus élevé provoque la dissociation de l'acide et la libération d'anions et de protons chargés qui ne peuvent plus traverser la membrane en sens inverse. La concentration en acide dans la cellule augmente et peut provoquer la rupture de la membrane, l'inhibition de réactions métaboliques vitales, un stress lié à l'homéostasie du pH intracellulaire et l'accumulation d'anions toxiques. Ces différents effets concourent à l'inhibition de la croissance bactérienne. L'inactivation liée aux acides organiques pourrait encore être compliquée par le fait qu'en milieu acide, l'adhésion des bactéries aux surfaces augmente (Firstenberg-Eden, 1981). Ainsi, le traitement à l'acide lactique de muscles de bœuf provoque la fixation à la surface de la viande d'une plus grande proportion de *Listeria monocytogenes* qu'un traitement équivalent avec de l'eau et des bactériocines (El-Khateib *et al.* 1993).

Les acides organiques les plus communément utilisés pour la décontamination de produits alimentaires sont l'acide lactique et l'acide acétique.



L'acide lactique (acide 2-hydroxypropanoïque $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) est le produit principal de nombreuses fermentations. Il présente deux stéréoisomères, L(+) et D(-), que l'on retrouve dans la nature, et sont toutes deux produites par fermentation du saccharose par les bactéries lactiques. La production d'acide lactique par synthèse chimique conduit

à un mélange 50/50 des formes L(+) et D(-). L'acide lactique a un pK_a de 3,83 et est fortement soluble dans l'eau.



L'acide acétique (acide éthanoïque, CH_3COOH) est produit par l'oxydation de l'alcool par des bactéries des genres *Acetobacter* et *Gluconobacter*. Il est communément utilisé sous forme de vinaigre (4% d'acide acétique) dans de nombreux aliments dans un but de conservation. L'activité antimicrobienne de l'acide acétique et de son sel, l'acétate de potassium augmente lorsque le pH diminue ou lorsque l'acide apparaît sous forme oxydé. Ainsi, l'acide peracétique (CH_3COOOH) qui se décompose en acide acétique et oxygène en présence de substrats organiques, a été utilisé comme désinfectant des surfaces de contact alimentaire.

II.2.2 Facteurs susceptibles de modifier l'efficacité des traitements par des solutions d'acides organiques

L'efficacité d'un traitement de décontamination par une solution d'acide organique donné dépend de nombreux facteurs compliquant la comparaison des résultats de la littérature. Les principaux sont bien sûr la durée du traitement et la concentration de la solution d'acide utilisée. Mais d'autres facteurs, comme la température et le mode d'application du traitement, la sensibilité des bactéries ciblées et le support sur lequel elles sont fixées, ou la présence d'une flore de compétition, peuvent également modifier de manière non négligeable l'efficacité des traitements.

a. Durée du traitement

Lors d'essais de décontamination d'aliments, la durée du traitement semble considérée comme un facteur secondaire. Lorsqu'elle est indiquée par les auteurs, trois niveaux peuvent être distingués :

- Durée de traitement inférieure à la minute (Bell *et al.* 1997; Okolocha et Ellerbroek, 2005; Ozdemir *et al.* 2006).
- Durée de traitement de l'ordre de 10 minutes (Capita *et al.* 2002a; Capita *et al.* 2003; Goncalves *et al.* 2005).

- Durée de traitement de 30 minutes à 1 heure (Hwang et Beuchat, 1995; Samelis *et al.* 2003).

Par ailleurs, cette période de contact entre l'aliment et l'acide (par immersion ou pulvérisation) est souvent suivie d'une période d'égouttage, pendant laquelle l'imprégnation en acide se poursuit et dont la durée n'est pas toujours précisée et peut pourtant varier de 30 secondes (Bell *et al.* 1997) à 2 heures (Goncalves *et al.* 2005). En tout état de cause, les rares études portant sur l'effet de la durée du traitement sur l'efficacité de la décontamination ne fournissent pas de résultats convaincants.

b. Concentration utilisée

D'une manière générale, la réduction bactérienne augmente avec la concentration en acide utilisée. En ce qui concerne l'acide lactique, un traitement à 1% de muscle de bœuf inoculé avec des *Salmonella* spp. ne réduit pas significativement le nombre de bactéries. Par contre une réduction de 0,7 log est observée dans le cas d'un traitement à l'acide lactique à 2% (Ozdemir *et al.* 2006). Ces réductions atteignent respectivement 0,1 et 0,4 log sur de la peau de porc (Van Netten *et al.* 1998).

Nous avons choisi dans le cadre de cette étude d'utiliser des solutions d'acide lactique. Dans ce cas précis, la littérature montre d'une manière générale qu'un traitement avec une solution d'acide lactique de 1% durant 5 minutes permet d'obtenir une réduction immédiate de l'ordre de 0,5 à 1 log pour des *Listeria monocytogenes* inoculées sur de la peau de poulet (Gonzalez-Fandos et Dominguez, 2006). La réduction est de l'ordre de 1 log lorsque la concentration en acide lactique est augmentée jusqu'à 2 ou 5%. Ces réductions bactérienne restent faibles ce qui, vu la précision des mesures ($\pm 0,1$ à 0,5 log), explique la variabilité des résultats observés dans la littérature. Il n'existe aucun (ou peu) de résultats pour des solutions dont la concentration en acide lactique dépasse 5% et aucune étude systématique n'est effectuée pour évaluer l'effet du temps de contact sur la décontamination directe.

c. Température et mode d'application du traitement

Les gammes de températures généralement utilisées dans les essais de décontamination vont de 4 à 10°C, de 20 à 25°C et autour de 55°C. Les températures de 4 à 10°C et 55°C sont choisies en fonction d'impératifs industriels car il s'agit respectivement de la température de l'eau utilisée lors du refroidissement par pulvérisation ou immersion des carcasses, et de la température de l'eau utilisée lors du nettoyage des carcasses. La température ambiante (20 à 25°C) est, quant à elle, plutôt utilisée lors des essais en laboratoire pour des raisons de commodité. Mais peu d'études ont cherché à comparer l'effet de la température d'application sur l'efficacité du traitement. Celles-ci sont présentées dans la partie « traitement combiné » de ce chapitre. Par ailleurs et si il existe, l'écart de température entre la pièce de viande et la solution de décontamination mène à un régime thermique transitoire qui ne permet pas de raisonner en termes de température de traitement. Ceci est particulièrement vrai lorsque les traitements sont courts et les volumes de solution appliqués faibles.

Le mode d'application du traitement influence également l'efficacité des traitements de décontamination. Okolocha et Ellerbroek (2005) montrent après 6 jours de stockage une réduction plus importante de la flore totale aérobie dans le cas du traitement à l'acide lactique par immersion par rapport à une pulvérisation avec des réductions de l'ordre de 2,3 log et 1 à 1,5 log respectivement. Ainsi, l'immersion est une méthode très efficace car elle garantit probablement une meilleure accessibilité du produit à la totalité de la surface à traiter. Elle présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Au-delà des problèmes pratiques qui peuvent se poser lorsque l'on veut immerger des grandes pièces de viande ou des carcasses entières, une bonne maîtrise de la concentration des solutions est souvent difficile. Le produit chimique se dépose sur la viande et réagit avec les microorganismes et les supports organiques. Les solutions acides perdent leur activité à mesure que les anions sont liés par les peptides et les protéines libérés par la viande, nécessitant un renouvellement fréquent de ces solutions à la surface des produits.

Aussi, la pulvérisation reste la technique la plus commune d'application de produits chimiques sur les carcasses de grande taille (bœuf, porc). En l'absence de recyclage de la solution, on peut garantir une concentration constante en produit chimique au détriment du coût de l'opération de décontamination.

La plupart des études antérieures à 1997 ont utilisé des systèmes de pulvérisation manuels (James et James, 1997). L'efficacité d'un système manuel, qu'il utilise de l'eau pure ou des solutions de produits chimiques, dépend fortement de l'habileté de l'opérateur et varie d'un opérateur à l'autre. Les résultats sont donc difficiles à comparer. De même l'efficacité des systèmes automatiques dépend de différents paramètres technologiques tels que la pression, la configuration des buses et le volume de produit pulvérisé. Au niveau local ces paramètres se traduisent par une plus ou moins grande accessibilité de la solution à la surface à traiter et par des temps de contact et des teneurs en composé chimique qui peuvent être différents. Au cours d'un traitement par pulvérisation de carcasses de poulet à l'acide lactique 1%, Okolocha et Ellerbroek (2005) ont observé une réduction immédiate de la flore totale aérobie de l'ordre de 0,4 log lors de la pulvérisation de 1 litre de solution et de l'ordre de 1,3 log lors de la pulvérisation de 2 litres de solution. Un effet identique est constaté lorsque la bactérie cible est *Salmonella* spp. où les traitements par pulvérisation avec 1 litre de solution d'acide lactique à 1% s'avèrent aussi peu efficaces qu'un simple nettoyage à l'eau (100% des carcasses positives) alors qu'une pulvérisation avec 2 litres de solution est significativement plus efficace (50% des carcasses positives, contre 70% dans le cas d'un traitement à l'eau).

d. Substrats et sensibilité des bactéries cibles

La sensibilité des bactéries aux traitements de décontamination dépend de facteurs tels que l'espèce et la souche bactérienne, l'état physiologique de la bactérie (sessile ou planctonique, en phase de croissance ou stationnaire) et l'environnement dans lequel elle se trouve (substrat, densité de population bactérienne, température).

Le substrat sur lequel les bactéries sont fixées est important. En effet, la localisation de la peau sur la carcasse induit des différences de comportement au traitement. Ainsi, lors d'un

traitement, la réduction bactérienne est significativement plus élevée sur la peau préalablement inoculée par *Listeria monocytogenes* et prélevée sur la poitrine et le dos que sur les pattes (écarts de l'ordre de 1 log). Cette différence est attribuée au plus grand nombre de follicules présents sur la peau des pattes, formant des anfractuosités où les bactéries peuvent se fixer et se trouver protégées des traitements (Capita *et al.* 2002c). De même, un traitement de décontamination appliqué sur des cuisses entières est moins efficace que lorsqu'il est appliqué sur la peau de cuisse seule (séparée des muscles et des os). Cette différence (de l'ordre de 1 log) s'explique par la présence, sur les cuisses entières, de zones auxquelles le traitement accède plus difficilement (Capita *et al.* 2003).

Le niveau d'inoculation modifie également l'efficacité des traitements. Ainsi, Greer et Dilts (1992) ont démontré que l'efficacité d'un traitement à l'acide lactique ou acétique sur des échantillons de bœuf est influencée de manière significative par le niveau de contamination initial. Cependant, cet effet ne trouve pas d'explication claire et varie selon les espèces bactériennes. Il pourrait s'agir de mécanismes de « quorum sensing » modifiant la réponse physiologique de populations bactériennes lorsque leur concentration dépasse un certain seuil les conduisant, par exemple, à former des biofilms.

La résistance accrue des bactéries formant des biofilms est un problème récurrent dans les industries agroalimentaires, surtout si les biofilms formés sont complexes. Ainsi, un traitement à l'acide acétique permet une réduction de plus de 3,8 logs d'une population de *Listeria monocytogenes* formant un biofilm mono-spécifique. Ce résultat diminue jusqu'à n'être égal qu'à 1,1 log lorsque *Listeria monocytogenes* est cultivée en biofilm multi-spécifique avec d'autres espèces bactériennes rencontrées sur les produits carnés (Ammor *et al.* 2004). Dans le cas de cultures monospécifiques de bactéries planctoniques (ne formant pas de biofilm), certaines conditions de culture peuvent augmenter la résistance aux traitements de décontamination. Ainsi, des bactéries peuvent être adaptées aux traitements acides par l'ajout de glucose au milieu de culture, ce qui entraîne une acidification progressive du milieu. Cette acidification provoque l'expression de gènes de résistance, rendant les bactéries insensibles à des baisses de pH brutales. Par exemple, des bactéries adaptées à la présence d'acides présenteront les mêmes réductions décimales après 30 et

60 minutes de traitement, alors que des bactéries de la même souche mais qui ne se sont pas préalablement adaptées aux acides présenteront des réductions décimales plus importantes lorsque le temps de traitement augmente (Samelis *et al.* 2003).

Au-delà de cette adaptation physiologique « rapide », des souches résistantes aux traitements peuvent être involontairement sélectionnées sur de longues périodes du fait de l'application répétées d'opérations de nettoyage ou de décontamination. Ce problème est fréquemment rencontré en milieu industriel où des flores indigènes très résistantes aux traitements de décontamination peuvent apparaître après quelques années de production ou de transformation répétées dans un même atelier.

e. Présence d'une flore de compétition

Au cours de la conservation de l'aliment, la présence d'une flore indigène peut modifier la dynamique de croissance des bactéries pathogènes ce qui introduit une cause de variabilité supplémentaire (Gillian et O'Beirne, 1998). C'est le cas d'une compétition entre deux populations bactériennes où la croissance exponentielle d'une des deux populations empêche le développement de la deuxième. Ce phénomène, généralement désigné sous le nom « d'effet Jameson », est mis en évidence dans les travaux de Ross, Dalgaard et Jørgensen (Dalgaard et Jørgensen, 1998; Ross *et al.* 2000). Par ailleurs, certaines flores spécifiques (flore lactique par exemple), produisent également des substances inhibant la croissance des autres bactéries bien avant qu'elles n'atteignent leur maximum de croissance. Ces phénomènes peuvent augmenter artificiellement l'efficacité apparente des traitements de décontamination.

II.2.3 Législation en vigueur

L'acide lactique est, avec ses sels de sodium, calcium et potassium classé GRAS (Generally Recognised as Safe) aux USA. Aucune teneur maximale n'est indiquée dans la réglementation, hormis pour les conserves de viande et les produits de charcuterie-salaison, où son emploi comme correcteur d'acidité est limité à 1 gramme par kilogramme de produit

(Anonymous, 1987). En revanche, pour pouvoir porter la dénomination « yaourt », les produits laitiers concernés doivent contenir au minimum 0,6 grammes d'acide lactique pour 100 gramme de produit (Anonymous, 1988). Il peut donc en principe être utilisé librement dans les produits alimentaires, pourvu que sa présence soit mentionnée sur les emballages en tant qu'additif.

Cependant, la réglementation en vigueur actuellement en Europe n'autorise pas l'utilisation d'autre substance que l'eau potable pour éliminer la contamination en surface des produits alimentaires sauf si l'utilisation de cette substance a été approuvée par le « comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale », selon les articles 3 et 12 du règlement CE 853/2004 (Anonymous, 2004). Cette formulation permet d'envisager l'utilisation de certaines substances permettant de décontaminer les carcasses, et la question est régulièrement posée aux différents organes scientifiques de l'union européenne, en particulier l'EFSA (European Food Safety Authority). L'avis le plus récent au niveau européen, rédigé en 2006 suite à une demande d'autorisation par la société PURAC, concerne l'efficacité de l'application d'acide lactique sur des carcasses de volaille (Anonymous, 2006b). L'EFSA ne donne pas d'évaluation de l'efficacité d'un tel traitement, à cause d'un manque de précision de la part de la société PURAC sur le but exact du traitement, les méthodes d'application et les concentrations d'acide lactique envisagées. Cependant, cet avis précise clairement que l'application d'un tel traitement de décontamination serait considérée comme une aide au procédé et devrait impérativement être suivie d'un rinçage.

Au niveau français, un avis de l'AFSSA datant de mars 2007 considère que la prévalence de *Salmonella* spp. dans les élevages de poulets de France métropolitaine n'est pas suffisamment importante pour justifier du recours à des techniques de décontamination sauf dans le cas d'actions ponctuelles (Anonymous, 2007c). Ces techniques pourraient par contre être utilisées sur d'autres espèces avicoles, ou bien pour lutter contre d'autres microorganismes comme *Campylobacter* spp. et d'autres pathogènes, pour lesquels il existe peu de moyens de maîtrise au niveau des élevages. L'avis conclut que le recours à la décontamination chimique de carcasses de volailles pourrait être envisagé à condition que

l'innocuité des substances utilisées et leur efficacité sur les pathogènes soit validée et que les déséquilibres de la microflore causés par le traitement au cours du stockage soient pris en compte. En fait, la position réservée de l'union européenne, et surtout des autorités françaises, face à l'application de méthodes de décontamination chimiques est d'avantage fondée sur la crainte d'une démobilisation des opérateurs de la filière, éleveurs et industriels, qui seraient susceptibles de relâcher leur vigilance par rapport aux normes d'hygiène en vigueur. Dans cette optique, il n'est pas impossible que les choses changent et que l'utilisation de solutions d'acide soit autorisée dans un avenir proche.

II.3. Effets de rémanence du traitement

Au delà de l'effet de décontamination immédiat, suite aux traitements, une quantité résiduelle de produit chimique est susceptible de rester localisée à la surface des pièces de viande et d'en assurer une protection. Très peu d'études ont tenté de mesurer ces teneurs résiduelles. Même les mesures de pH de la peau sont rares et généralement réalisées dans le but d'évaluer les modifications organoleptiques du produit après traitement.

Ces quantités résiduelles, bien que trop faibles pour s'avérer bactéricides, peuvent suffire à exercer une certaine activité bactériostatique sur les bactéries ayant survécu au traitement de décontamination. Cet effet de rémanence du traitement peut permettre de prolonger la date limite de consommation des produits, même dans le cas d'un stockage en froid positif, ce qui intéresse particulièrement les industriels des pays exportateurs de viande (Australie, Nouvelle Zélande). Du point de vue de la santé publique, cet effet est également intéressant car de nombreuses bactéries pathogènes continuent à se multiplier à des températures assez basses et peuvent atteindre des concentrations dangereuses pour l'homme après quelques jours de conservation dans les réfrigérateurs domestiques. Plusieurs travaux scientifiques soulignent l'importance de cette rémanence. Ainsi, lors du traitement d'ailes de poulet par immersion dans un mélange d'acide lactique à 0,5% et de benzoate de sodium à 0,05%, après 8 jours de stockage à 4°C, les populations de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157:H7 se sont avérées significativement plus faibles que sur des témoins non traités (réductions de l'ordre de 1,2 log pour *Listeria* spp.

supérieures à 2,0 log pour *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp.) et la croissance des bactéries psychrotrophes a été retardée de manière significative (Hwang et Beuchat, 1994). Par ailleurs, sur des carcasses de poulet traitées à l'acide lactique à 1%, la réduction de la flore totale est supérieure après 6 jours de conservation à 4°C, atteignant 2,3 log pour un traitement par immersion (Okolocha et Ellerbroek, 2005). De même, sur du muscle de bœuf, après un traitement à l'acide lactique à 2% et durant 5 jours de conservation à 4°C, la réduction du nombre de *Salmonella* typhimurium atteint 1,14 log, et la réduction du nombre de *Listeria monocytogenes* 2,54 log, alors que les réductions immédiates n'étaient que de 0,70 et 1,09 log respectivement. Dans le cas de *Salmonella* spp. on peut même considérer que l'acide lactique poursuit son activité bactéricide car il induit une réduction bactérienne significative par comparaison au témoin. Pour *Listeria monocytogenes* qui est psychrophile, la croissance bactérienne se poursuit au cours du stockage sur les témoins non traités. La croissance bactérienne est cependant plus faible sur les échantillons traités. Par conséquent, il s'agirait plutôt pour *Listeria monocytogenes* d'une activité bactériostatique de l'acide lactique (Gonzalez-Fandos et Dominguez, 2006; Ozdemir *et al.* 2006).

Il faut cependant noter qu'à notre connaissance, aucune étude n'a concerné l'effet sur la rémanence d'un rinçage éventuel des surfaces réalisé après l'application du traitement. Cela pose problème d'un point de vue législatif. Les positions actuelles de l'union européenne et des autorités sanitaires françaises sur ce domaine sont développées au paragraphe II.2.3 ci-dessus. Rappelons simplement que l'avis le plus récent de l'EFSA (European Food Safety Authority) indique que l'application d'une substance chimique telle que l'acide lactique pour la décontamination des carcasses de volaille devrait obligatoirement être suivie d'un rinçage. En ce qui concerne l'évaluation de l'effet des solutions de décontamination immédiatement après traitement, l'absence de rinçage s'explique par la technique de dénombrement des bactéries utilisée, impliquant toujours une agitation forte ou un broyage des échantillons dans un liquide tel que l'eau ou l'eau peptonnée, constituant *de facto* un rinçage intensif. En revanche, l'inexistence de données concernant l'impact du rinçage sur l'effet de rémanence des traitements constitue un manque qu'il conviendrait de combler.

Par ailleurs, l'effet de protection des traitements vis à vis d'éventuelles recontaminations reste complexe. Deux phénomènes antagonistes entrent en jeu simultanément. La teneur résiduelle en produit de décontamination limite de manière générale la croissance des bactéries mais la disparition des flores de compétition du fait du traitement peut favoriser la croissance des pathogènes. Par exemple, Nissen *et al.* (2001) ont mené une étude sur des muscles de poulet et de bœuf et des peaux de porc préalablement traitées par de l'acide lactique à 0,2M (1,8%), refroidies et inoculées respectivement avec *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* et *Escherichia coli* O157:H7. Après conservation à 10°C durant 5 jours à pression atmosphérique et 21 jours sous vide, la concentration en pathogènes augmente dans tous les cas au cours du temps et est généralement supérieure sur les pièces traitées par l'acide. La décontamination favoriserait ainsi la croissance de certains pathogènes dans le cas d'une recontamination ultérieure. Ceci est attribué à une diminution de l'effet de compétition liée à la réduction de la flore totale suite au traitement par l'acide lactique. Inversement, Van Netten *et al.* (1998; 1997) ont étudié l'évolution de peaux de porc ayant subi une immersion dans des solutions d'acide lactique à 2% (traitement de décontamination) ou dans de l'eau seule (témoin). Ces peaux sont ensuite inoculées avec des bactéries pathogènes (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* et *Listeria monocytogenes*) adaptées à l'acide lactique et aux basses températures par des techniques de culture spécifiques. Ils montrent que le nombre de bactéries évolue dans ce cas de manière semblable pour des peaux traitées et des témoins non traités. Ces résultats ont été observés à partir du premier jour de conservation et quelle que soit la température de stockage (4°C ou 12,5°C). Dans cette étude, le traitement de décontamination n'a donc pas d'effet sur les recontaminations ultérieures.

II.4. Effets non souhaités

II.4.1 Apparition de résistances bactériennes

Certains auteurs ont exprimé leur inquiétude quand à l'adaptation des pathogènes à la présence d'acide lactique et d'autres acides organiques durant le stockage qui pourrait instituer un nouveau facteur de risque. Davidson et Harrison (2002) classent la résistance

des microorganismes aux traitements de décontamination en trois catégories : innée, acquise et apparente. Une résistance innée est présente naturellement chez les microorganismes et varie selon les types, genres, espèces et souches. *Cryptosporidium spp.* par exemple, est naturellement résistant au chlore. Une résistance acquise apparaît suite à une mutation du génome bactérien ou à l'acquisition de matériel génétique provenant d'autres microorganismes. Ce phénomène concerne plutôt les antibiotiques que les agents de décontamination qui sont généralement non spécifiques. La résistance apparente dépend quant à elle des conditions de mesure. La présence d'autres stress (pH, température, pression) peut augmenter ou diminuer la résistance des microorganismes, en favorisant la formation de spores, ou l'expression de gènes produisant des protéines spécifiques (facteur Sigma, par exemple). Les conditions du milieu peuvent également modifier l'agent décontaminant. Dans des produits alimentaires à pH faible, des acides faibles comme l'acide lactique se trouvent en plus grande proportion sous forme non dissociée ce qui favorise leur pénétration dans la membrane cellulaire. Dans des produits alimentaires riches en lipides, les bactéries semblent plus résistantes du fait de la mauvaise solubilisation ou de la fixation des antimicrobiens (antibiotiques ou agents de décontamination) aux lipides.

A notre connaissance, aucune étude n'a démontré que la décontamination de surfaces de volaille ou d'autres animaux par des solutions acide ou basique entraînait l'apparition de populations résistantes. Des études menées *in vitro* montrent tout de même l'apparition de phénomène de tolérance à l'acide sur des bactéries cultivées dans un milieu contenant de l'acide lactique. La culture de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 et *Salmonella typhimurium* dans des milieux liquides dont le pH est diminué grâce à de l'acide lactique permet d'obtenir des cellules plus résistantes à un choc acide. Les différences de réductions décimales entre bactéries adaptées et non adaptées peuvent dépasser 2,8 log pour *Salmonella Typhimurium* et *Listeria monocytogenes* (Koutsoumanis et Sofos, 2004; Samelis *et al.* 2003). Cependant, il s'agit là de conditions de culture assez éloignées de ce que l'on peut trouver sur un produit réel.

II.4.2 Altération des propriétés sensorielles

Les traitements de décontamination ne sont acceptables que s'ils ne modifient pas de manière significative les propriétés organoleptiques du produit fini. Des traitements avec des solutions chimiques concentrées peuvent entraîner des décolorations en surface des produits ou l'apparition de goûts, d'odeurs et de saveurs désagréables. L'effet des traitements sur les qualités organoleptiques dépendent du type de composé utilisé, de la concentration des solutions, de la température, du temps de traitement, du produit alimentaire qui est traité (poulet, bœuf, porc, peau ou muscle nu, etc.) et de sa destination commerciale. Par exemple, une décoloration de la peau ou de la surface entraînée par un traitement de décontamination n'est importante que si le produit est ensuite commercialisé en frais. Si lors du procédé de transformation la peau des volailles est retirée avant commercialisation ou bien si le muscle légèrement blanchi par le traitement de décontamination est ensuite cuit et incorporé dans une préparation, aucune altération visuelle du produit fini ne sera observée.

Sur le poulet, les études qui mentionnent l'effet des traitements sur les propriétés organoleptiques des produits ne mettent pas en évidence de différences significatives de goût, de couleur ou d'acceptabilité de pièces de carcasses (hauts de cuisse ou pilons) cuites après traitement. Seule une légère décoloration des produits crus est observée par certains auteurs (Gonzalez-Fandos et Dominguez, 2006; Okolocha et Ellerbroek, 2005; Van Der Marel *et al.* 1989). Cependant, aucun des traitements étudiés ne met en jeu des concentrations en acide qui excèdent 5%.

La mesure de la teneur résiduelle en acide est nécessaire afin de mieux comprendre la rémanence des traitements de décontamination ainsi que l'éventuel impact organoleptique sur la pièce de volaille. Mais cette mesure n'est réalisée qu'exceptionnellement dans la littérature (Van Der Marel *et al.* 1989). Les résultats montrent qu'un traitement de 15 secondes avec une solution d'acide lactique de concentration 5% augmente la teneur en acide lactique de la peau de poulet d'environ $2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Cette augmentation est faible par rapport à la teneur naturellement présente dans la peau, à savoir $1,33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ juste après abattage et $2,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ après 3 jours de conservation. A priori l'acide lactique ajouté au cours

des traitements de décontamination reste majoritairement à la surface du produit et ne traverse pas la peau pour pénétrer dans le muscle. A l'issue d'un traitement par l'acide lactique à une concentration de 5%, Van der Marel (1989) n'observe aucune augmentation de la teneur en acide dans le muscle, même après 3 jours de conservation. Du point de vue purement gustatif, l'acide lactique est également intéressant car en solution à pH et concentration égale, il est moins amer que les acides citrique, malique et acétique, et présente un goût plus proche du « salé » que du « vinaigre ». L'acide acétique, en revanche, présente le goût le plus prononcé (Hartwig et McDaniel, 1995).

III. Traitements thermiques de décontamination

III.1. De la thermo-inactivation en milieu liquide à celle des carcasses

La croissance et le métabolisme des bactéries sont différents selon la zone de température considérée. Aux faibles températures, les bactéries sont au repos, caractérisées par un minimum d'échanges avec le milieu et une survie sans multiplication. La température minimale de croissance est ainsi de 1°C pour *Listeria monocytogenes*, 5°C pour *Salmonella* Enteritidis et 28°C pour *Campylobacter jejuni*. Lorsque la température est augmentée jusqu'à atteindre la température optimale de croissance, les bactéries se multiplient de manière exponentielle, de 30 à 39°C pour *L. monocytogenes*, 35 à 43°C pour *S. Enteritidis*, et 37 à 42°C pour *C. jejuni* (Anonymous, 2002; Anonymous, 2006a; Anonymous, 2006c). En zone sublétale, la croissance des bactéries est inhibée. Finalement, à des températures supérieures, en zone létale, les bactéries sont définitivement inactivées.

L'inactivation thermique en milieu liquide (bouillon de culture) de la plupart des bactéries pathogènes est maintenant assez bien connue. Le modèle classique d'inactivation thermique prend comme hypothèse que toutes les bactéries constituent une population homogène, i.e. les bactéries sont génétiquement identiques, de même âge, et dans le même état physiologique (Smelt *et al.* 2002). Elles présentent donc toutes la même probabilité d'inactivation par le traitement. La température du traitement est supposée constante et se situe dans la zone létale (aucune croissance bactérienne, inactivation définitive des bactéries). Dans ce cas, la cinétique de destruction thermique est décrite par une relation d'ordre 1 qui, exprimée en logarithme décimal, suit une évolution linéaire (Eqn 1), avec N_t le nombre de bactéries à l'instant t , N_{t0} le nombre initial de bactéries, D_T la durée de réduction décimale à la température T et à l'instant t .

$$\log_{10}(N_t) = \log(N_{t_0}) - \left(\frac{1}{D_T}\right) \cdot t \quad \text{Eqn 1}$$

Les cinétiques de destruction thermique sont décrites par la durée D_T nécessaire pour qu'un traitement thermique à une température T diminue de 1 log le nombre de bactéries et l'élévation de température z nécessaire pour diviser D_T par 10 (Eqn 2).

$$\log_{10}(D_T) = a - \left(\frac{1}{z}\right) \cdot T \quad \text{Eqn 2}$$

Quelques valeurs de D_T et z mesurées sur les microorganismes pathogènes ciblés dans cette thèse sont présentées à titre d'exemple dans le Tableau 5.

Les hypothèses sous-jacentes au modèle log linéaire ne sont pas toujours vérifiées, même en milieu liquide, lorsque les températures de traitement sont très légèrement létales. Même dans le cas d'une population de bactéries identiques (souche et état physiologique), celles-ci ne présentent pas toutes la même probabilité d'inactivation par le traitement thermique et peuvent se comporter comme si la population bactérienne était composée de deux sous-populations présentant des caractéristiques différentes, une population « moyenne » et une population « plus résistante » (Figure 2), ce qui se traduit par un phénomène de traînée dans la zone de début d'inactivation thermique (Humpheson *et al.* 1997). Ceci est renforcé par le fait qu'en pratique dans le cas de décontaminations industrielles de produits alimentaires, les populations bactériennes rencontrées ne sont pas homogènes. Il s'agit généralement d'un mélange de plusieurs espèces bactériennes différentes, à des âges et des états physiologiques différents, ce qui modifie leur réponse aux traitements.

Lorsque les bactéries ne sont plus en suspension dans un liquide, mais fixées à un produit alimentaire, leur réponse aux traitements thermiques se modifie fortement (changement de physiologie, biofilms, etc). Par exemple, *Salmonella* spp. et *Listeria* spp. sont significativement plus résistantes à un même traitement thermique lorsqu'elles sont inoculées dans un broyat de poulet (Tableau 5) que lorsqu'elles sont en suspension dans un bouillon nutritif (Murphy *et al.* 2000).

En plus de l'effet de structure du produit, la réponse des bactéries au traitement thermique dépend également des conditions de pH, d' a_w , de teneur en sel et de la composition du milieu. Ainsi, la résistance des *Salmonella* spp. inoculées dans un broyat de poulet augmente de manière significative lorsque le taux de matière grasse du broyat augmente (Juneja *et al.* 2001). Comme les produits alimentaires sont généralement fortement hétérogènes et qu'ils présentent des caractéristiques physico-chimiques variables d'un échantillon à l'autre, ceci peut expliquer en partie les différences de réponse des bactéries aux traitements thermiques souvent observées dans la littérature.

Les bactéries fixées à la surface des aliments sont en général plus résistantes que dans les broyats. Ceci a été montré sur *Salmonella* spp. qui est beaucoup plus résistante lorsqu'elle est fixée à la surface de muscles de bœuf que lorsqu'elle est inoculée sur un broyat du même muscle (Orta-Ramirez *et al.* 2005) Les cinétiques d'inactivation observées pour des bactéries en suspension ne permettent donc pas de prévoir leur cinétique d'inactivation lorsqu'elles sont fixées sur un support (Valdramidis *et al.* 2007).

La contamination initiale en bactéries pathogènes des produits alimentaires étant généralement faible et très variable, la plupart des essais réalisés en laboratoires portent sur le traitement de produits artificiellement inoculés avec des cultures de bactéries pathogènes. Même si les produits inoculés sont similaires, ils peuvent présenter des flores indigènes différentes, susceptibles d'interagir avec les pathogènes inoculés. Par ailleurs, au-delà des différences dans les souches utilisées pour l'inoculation, la méthode même de l'inoculation peut avoir une influence non négligeable sur l'efficacité des traitements de

décontamination. Dans le cas d'une inoculation avec des bactéries mises en suspension dans une solution de fèces, technique couramment employée par les équipes américaines (Bell *et al.* 1997; Cutter et Rivera-Betancourt, 2000; Dorsa *et al.* 1997; Kochevar *et al.* 1997), les bactéries peuvent se fixer à la surface des particules solides présentes dans les fèces. Elles auront donc un comportement différent de bactéries mises en suspension dans un bouillon nutritif, ou dans de l'eau physiologique. De plus, ces bactéries qui n'adhèrent à la surface des produits alimentaires que par l'intermédiaire des particules seront souvent plus faciles à détacher sous l'effet d'un nettoyage que les bactéries adhérant directement au support.

Lorsque l'inoculum bactérien est déposé à la surface d'un produit en contact avec de l'air sec il sèche, ce qui conduit à un changement de l'état physiologique des bactéries. Ce stress est susceptible de modifier la réponse des bactéries au traitement de décontamination (Valdramidis *et al.* 2007).

Lors du traitement thermique d'un produit alimentaire solide il existe des gradients de température dans le produit qui peuvent conduire à des valeurs d'inactivation différentes. Ces hétérogénéités de traitement doivent toujours être évaluées pour savoir si elles peuvent effectivement expliquer les différences de décontamination observées. Ainsi, dans le cas de la peau de volaille, les bactéries fixées dans les follicules plumeux ou dans les crevasses ne se trouvent au maximum qu'à quelques dixièmes de millimètre sous la surface, l'épaisseur de l'épiderme des volailles excédant rarement 1,5 mm. Lors des traitements thermiques, elles sont exposées à des températures très proches de la température de la surface, ce qui ne peut donc expliquer les différences de décontamination observées (Kondjoyan *et al.* 2006).

Une des grandes difficultés lors de l'étude de la décontamination de la surface des produits est la mesure de la température de cette surface. Le plus souvent, les auteurs se contentent d'indiquer la température de la vapeur ou de l'air chaud qui arrive au contact du produit. Ceci ne donne une idée que de la température maximale qui peut exister à la surface du produit et non de la température à laquelle sont réellement soumises les bactéries au cours du traitement. Mesurer la température de la surface en utilisant des thermocouples est

difficile. Si le thermocouple est placé au-dessus de la surface du produit, la température mesurée sera proche de la température de la vapeur (surestimation), s'il est placé dans le produit juste sous la surface, la mesure sera sous-estimée. De plus les thermocouples ont toujours une certaine inertie qui fausse l'évaluation de la dynamique des phénomènes. Les capteurs infrarouges sont à privilégier car ils ont l'avantage de n'avoir qu'une faible inertie et de mesurer la température sur une très faible épaisseur à la surface du produit. Mais dans les jets de vapeur de telles mesures sont rendues difficiles du fait des fortes variations de l'émissivité de la surface lorsqu'il y a formation de condensats, de l'absorption du rayonnement infrarouge par les gouttelettes d'eau du jet de vapeur, et du rayonnement infrarouge émis par le jet de vapeur lui-même (Techasena et Flick, 1995). L'utilisation de capteurs infrarouges nécessite donc des procédures complexes d'étalonnage pour compenser ces biais (Kondjoyan et Portanguen, 2008a).

La deuxième méthode consiste à placer un thermocouple à une distance fixée de la surface du produit. Si les propriétés thermiques du système sont connues (diffusivité thermique et capacité thermique du produit, coefficient de transfert de chaleur entre la surface et l'extérieur), il est possible, grâce à une technique de modélisation inverse de calculer la température de la surface du produit (Hoke *et al.* 2003; Techasena et Flick, 1995). Cette méthode est inadaptée au cas des produits peu épais, comme les peaux de volailles, pour lesquels il est difficile de déterminer les propriétés thermiques, et qui ne permettent pas de placer précisément un thermocouple à une distance connue de la surface. Selon la méthode employée, les résultats peuvent varier de manière importante, et conduire à sous-estimer ou surestimer les durées de traitement nécessaires pour obtenir une réduction bactérienne donnée. Ainsi, la durée de traitement nécessaire pour assurer une même valeur stérilisatrice (réduction bactérienne identique à celle obtenue lors du traitement à 121,1°C de microorganismes présentant une valeur de Z de 10°C, comme par exemple les spores de *Clostridium perfringens*) est évaluée à 4 minutes lorsque l'on se fie aux mesures fournies par un thermocouple placé à la surface du produit, 12,8 minutes lorsque l'on utilise un capteur infrarouge, et 2,7 minutes en utilisant une méthode directe (thermocouple en profondeur) (Techasena et Flick, 1995).

III.2. Traitements de décontamination par l'eau chaude

Lors des traitements de décontamination par l'eau chaude, la réduction bactérienne due à l'effet thermique (destruction bactérienne), s'accompagne d'une action de nettoyage des souillures et donc des bactéries qui adhèrent à ces souillures. Lorsque le traitement est effectué par jet d'eau l'effet mécanique de frottement sur la surface est important et peut conduire au décrochage des bactéries qui adhèrent à même la surface. Ce phénomène augmente avec la pression et la vitesse du jet (Crouse *et al.* 1988). Dans la littérature, ces paramètres ne sont pas toujours mesurés avec précision. Le fait qu'il soit difficile d'appliquer uniformément des traitements par jets d'eau sur des carcasses, qui présentent une géométrie complexe, peut expliquer certains écarts de résultats rencontrés dans la littérature.

Smith et Graham (1978) ont démontré que l'immersion dans de l'eau chaude est une méthode efficace pour éliminer les bactéries de la surface de la viande. Des essais en laboratoire ont été réalisés sur des échantillons de tissus de bœuf et de mouton inoculés avec $6,5 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ de *Escherichia coli* ou de *Salmonella spp.* Après 10 secondes d'immersion dans de l'eau à 60°C en circulation, une réduction d'environ 1 log a été obtenue sur les échantillons de mouton et de bœuf, pour les deux souches étudiées. A 80°C, la réduction était de plus de 2 log sur le bœuf et 3 log sur le mouton. Mais ces résultats ne peuvent être considérés comme généralisables. Ainsi, sur des carcasses d'agneau, James *et al* (2000b) observent une réduction de 1 log de la flore totale aérobie mésophile après un traitement de 8 secondes dans de l'eau à 90°C.

Les essais ont été poursuivis sur des carcasses de moutons en utilisant une technique de pulvérisation, mais les réductions d'*Escherichia coli* obtenues n'excédaient pas 1 log, même en augmentant la température de l'eau de 85 à 90°C (Graham, 1979). Le problème ayant été attribué à la diminution de la température du jet d'eau pulvérisée lors de son trajet dans l'air ambiant, différents systèmes de cabine ont été ensuite développés pour limiter ces pertes. Un système fermé a été mis au point, qui a permis d'atteindre en laboratoire des réductions du nombre d'*Escherichia coli* de 3,4 log à l'extérieur des carcasses et de 1,3 log dans la cavité

interne, ces résultats étant similaires aux résultats obtenus par immersion. En conditions industrielles, ce système s'est avéré capable de traiter plus de 300 carcasses de moutons à l'heure, avec des réductions moyennes de 2,5 log tant sur la flore totale aérobie que sur les coliformes. Les carcasses traitées présentaient un léger « aspect cuit », mais cet effet disparaissait après une nuit de conservation au froid entre 1 et 4°C (Graham *et al.* 1978).

Un système similaire, adapté cette fois au traitement de carcasses de bœuf, a été développé en Australie en réponse à la proposition de l'USDA d'imposer un traitement antimicrobien avant le refroidissement des carcasses. Lors de tests réalisés à petite échelle dans un abattoir du Queensland en Australie, en utilisant de l'eau à 79°C (température de surface : 76°C environ) et un temps de contact d'environ 17 secondes, la réduction moyenne du nombre d'*Escherichia coli* en surface des carcasses était d'environ 2 log (Davey, 1988; Davey et Smith, 1989). Des résultats similaires ont été obtenus lors d'essais exhaustifs menés dans 6 grands abattoirs américains, montrant qu'il était possible de réduire de 2 log la flore totale aérobie et de 1,82 log le nombre d'*Escherichia coli* initialement présent sur les carcasses en utilisant de l'eau chaude à une température comprise entre 74°C et 87,8°C (Reagan *et al.* 1996). Ces réductions n'étaient plus que de 0,96 et 1,04 log respectivement lorsque l'eau utilisée était froide (28°C à 42°C). Ces différences peuvent s'expliquer à la fois par une augmentation de l'efficacité du nettoyage et par un réel accroissement de l'inactivation des bactéries liés à l'élévation de la température de l'eau. D'autres essais de traitement par l'eau chaude ont également montré l'efficacité du traitement pour réduire la fréquence de détection de *Listeria* spp. *Salmonella* spp et *Escherichia coli* O157 :H7 en surface de carcasses de bœufs

Les traitements à l'eau chaude présentent cependant un certain nombre d'inconvénients. La température maximale du traitement ne peut pas dépasser 100°C. L'immersion dans un bac d'eau chaude permet d'obtenir un traitement uniforme, mais induit des risques de contaminations croisées entre carcasses en cas de mauvais contrôle du procédé. La pulvérisation d'eau chaude permet difficilement d'obtenir un traitement uniforme des carcasses, comme le montre les différences de réduction bactérienne observées à l'extérieur des carcasses et dans leur cavité interne lors des essais réalisés par Graham (1979). Par

ailleurs, l'utilisation de jets d'eau à forte pression peut entraîner une pénétration des bactéries en profondeur du produit. Des études sur la pénétration des bactéries dans la viande durant le lavage ont été réalisées en utilisant un colorant insoluble (Blue Lake). De Zuniga *et al.* (1991) ont démontré que de fortes pressions de pulvérisation avaient tendance à faire pénétrer le colorant de la surface vers l'intérieur de la viande et une relation empirique entre la pression de pulvérisation et la profondeur de pénétration du colorant a été établie par les auteurs. Anderson *et al.* (1991; 1992) ont étendu ces relations empiriques à différents types de tissus. Les surfaces les plus sensibles à la pénétration des bactéries sont celles dont les protections naturelles existant à la surface ont été enlevées, les tissus coupés étant les plus sensibles à la pénétration (Anderson *et al.* 1991; Anderson *et al.* 1992; De Zuniga *et al.* 1991).

III.3. Traitements par l'air chaud et la vapeur

Les traitements par l'air chaud ou la vapeur entraînent en général de faibles effets de frottement mécaniques (sauf quand les vitesses de jets sont très élevées) contrairement aux traitements utilisant l'eau chaude. Il n'y a donc pas de risque de pénétration des bactéries de la surface de la carcasse vers l'intérieur. La réduction du nombre de bactéries présentes sur les surfaces provient d'une inactivation de ces bactéries, et non d'un effet de nettoyage. De plus, l'utilisation de l'air chaud ou de la vapeur permet d'atteindre des températures qui sont supérieures à 100°C en surface du produit. Enfin les traitements par la vapeur facilitent l'accès à des parties des produits qui ne sont pas directement exposées au traitement.

III.3.1 Air chaud

Lors des traitements par air chaud, la destruction bactérienne causée par la température pourrait être en partie ralentie par une diminution de l'activité de l'eau en surface du produit. Sur des surfaces de bœuf, lors d'un traitement par l'air chaud, un exemple de la relation entre la température de l'air, la température de la surface du produit, son a_w de surface et la concentration en *Salmonella* Typhimurium DT104 inoculées à la surface au cours d'un traitement à l'air chaud est présentée Figure 3 (McCann *et al.* 2006a).

Les résultats montrent une diminution très nette de l'activité de l'eau en surface du produit. Cette forte diminution accompagnée d'une moins grande efficacité des traitements par l'air chaud comparés aux résultats obtenus en vapeur pure, toutes choses étant égales par ailleurs, laisse présumer que l'activité de l'eau a un rôle important dans la résistance des micro-organismes aux traitements thermiques de surface. Ce phénomène a également été observé lors de l'inactivation par jet d'air chaud de *Listeria monocytogenes* inoculées sur des pommes de terre.

En milieu liquide, l'augmentation de la résistance des bactéries aux traitements thermiques lorsque l' a_w du milieu diminue est connue de longue date. Cependant, ce phénomène dépend grandement de l'espèce voire même de la souche bactérienne, mais aussi de la substance utilisée pour modifier l' a_w du milieu (Goepfert *et al.* 1970). Ainsi, la valeur de D de *Salmonella* Typhimurium est de 46,7 et 2,6 min respectivement dans des solutions de sucrose et de glycérol de même a_w (0,90). De plus, une étude récente a montré que pour *Salmonella* Typhimurium, l'abaissement du milieu à une a_w de 0,94 augmente la résistance des bactéries à des traitements thermiques à des températures supérieures à 53-55°C, mais rend les cellules plus sensibles si le traitement est appliqué à une température inférieure (Aljarallah et Adams, 2007). Aux températures inférieures à 53-55°C, la destruction des bactéries est corrélée au nombre de cellules présentant des lésions des membranes cellulaires, rendant les cellules plus sensibles au stress osmotiques, qui est d'autant plus important que l' a_w du milieu est faible. La diminution de l' a_w du milieu rend donc les bactéries plus sensibles aux traitements thermiques, et vice-versa. A des températures supérieures à 53-55°C, en revanche, la destruction des bactéries est corrélée à l'inactivation des ribosomes, qui sont en revanche plus stables si l' a_w du milieu est faible. La diminution de l' a_w rend donc les bactéries plus résistantes aux traitements thermiques (Mattick *et al.* 2001). Ces résultats, obtenus en milieu liquide, sont difficilement transposables au cas de bactéries fixées à la surface de produits alimentaires, mais on peut considérer que les mêmes mécanismes de résistance sont susceptibles de prendre place si la température du traitement est considérablement plus élevée, comme dans le cas d'un traitement à l'air chaud à 100°C.

Malgré l'augmentation de la résistance des cellules liée à l'assèchement des surfaces, les réductions bactériennes obtenues avec de l'air chaud peuvent être importantes. Ainsi, en simulant un traitement thermique sur des surfaces de bœuf inoculées par *Salmonella* Typhimurium et *Escherichia coli* O157:H7 (augmentation de la température de surface de 5 à 100°C en 50 secondes, puis maintien durant 10 secondes), McCann *et al.* (2006a) ont pu obtenir des réductions bactériennes de l'ordre de 5 log. Un travail a été effectué pour tenter d'intégrer cet effet dans les modèles décrivant l'inactivation par jet d'air chaud de microorganismes adhérant sur des pièces de bœuf (Valdramidis *et al.* 2006) mais la variabilité des données expérimentales ne permet pas d'arriver à un modèle fiable .

III.3.2 Traitement par la vapeur - température de surface inférieures ou égales à 100°C

Lorsqu'il n'y a pas de condensats à la surface du produit, la vapeur d'eau, qui est sous forme de gaz, peut accéder plus facilement à des parties du produit qui ne sont pas directement exposées au traitement telles que la partie interne d'une carcasse ou les parties vésiculaires de la peau (follicules). Les molécules d'eau sont considérablement plus petites que les bactéries, $2 \cdot 10^{-4}$ µm de diamètre, comparé aux 0,7 sur 4 µm des cellules de *Salmonella*. La vapeur est donc bien capable d'atteindre théoriquement des bactéries présentes dans les cavités, s'il n'y a ni obstacle, ni condensation. Bien que la vitesse de la vapeur soit réduite par des cavités de diamètre inférieur au trajet libre moyen des molécules, cela n'empêche théoriquement pas la vapeur d'atteindre les bactéries logeant dans les follicules. Par exemple, dans une vapeur saturée à 140°C, le trajet libre moyen des molécules d'eau est de 0,4 µm, soit la moitié du diamètre de la plus petite cavité capable de contenir une cellule de *Salmonella* spp. (Morgan *et al.* 1996a). En pratique la pénétration de la vapeur dans les cavités peut être fortement réduite, voire stoppée, par les condensats qui se forment à la surface du produit.

Au début du traitement, la température de la surface du produit est inférieure à celle de la vapeur, qui en condensant, entraîne un échange d'énergie important. Celui-ci se traduit par

un brusque accroissement de la température de surface qui atteint très rapidement une valeur proche de la température de la vapeur qui impacte le produit (100°C à pression atmosphérique). Les condensats formés à la surface du produit, bloquent alors l'accès de la vapeur aux follicules, et limite les transferts thermiques vers l'intérieur du produit.

Les traitements par la vapeur de produits de formes complexes s'effectuent classiquement en « cloche à vapeur ». C'est une enceinte en forme de cloche qui peut être plus ou moins ouverte dans sa partie inférieure. La vapeur d'eau qui est moins dense que l'air ambiant (sa masse molaire est de 18 g, contre 29 g pour l'air, et elle est en général légèrement plus chaude que l'air) se concentre dans la partie supérieure de la cloche où est localisé le produit.

Il est possible de fermer complètement l'enceinte et de traiter le produit à des pressions inférieures à la pression atmosphérique, ce qui diminue la température d'ébullition de l'eau. Cette méthode présente l'intérêt d'éliminer les gaz incondensables provenant soit de l'air présent autour du produit lors de son introduction dans la zone de traitement, soit de l'air entraîné par le jet de vapeur soit des gaz piégés dans les follicules et les replis du produit ou désorbés lors du chauffage du produit. Ces gaz incondensables sont concentrés par l'afflux de vapeur à la surface du produit et ralentissent la condensation de la vapeur et les échanges thermiques. La température du traitement étant faible, les phénomènes de cuisson du produit peuvent être évités, mais les durées de traitement sont grandes. Ainsi, avec des traitements de 8 minutes à 66°C et 4 minutes à 71°C, Klose *et al* (1971) atteignent des réductions de 4,39 et 3,21 log respectivement sur des poulets inoculés avec *Salmonella* Typhimurium. Par ailleurs, cette méthode nécessite des équipements assez complexes et donc difficiles à mettre en œuvre dans l'industrie.

Pour traiter sur une face des échantillons de taille réduite, il est possible d'appliquer à la surface du produit des jets de vapeur qui peuvent être surchauffés ou au contraire refroidis par mélange avec l'air. Il se forme dans un premier temps des condensats dans la zone d'impact de la vapeur avec la surface froide du produit. Ces condensats peuvent ensuite s'évaporer rapidement lorsque la vapeur est fortement surchauffée. Lors de cette deuxième

phase le traitement se rapproche alors d'un traitement par l'air chaud (Malbrancq et Kondjoyan, 2004).

L'efficacité de décontamination du traitement tend à augmenter avec un accroissement de la température de la vapeur, ce qui se traduit par des durées de traitement plus courtes pour arriver à une même quantité de bactéries inactivées. Ainsi, lors d'un traitement de 10 secondes avec de la vapeur à 100°C (température de surface estimée à 97,8°C) James *et al.* (2000a) observent des réductions de 1,65 log de la flore totale aérobie mésophile indigène et 1,90 log pour *Escherichia coli* O157:H7 inoculée à la surface de poitrines de poulet avec la peau. Des résultats ont aussi été obtenus sur d'autres bactéries par les mêmes auteurs dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 4). Ils conduisent notamment à des réductions décimales de 1,8 log pour *Campylobacter jejuni* AR6 et 1,7 log pour *Escherichia coli* K6 lors de traitements de 10 secondes par la vapeur à 100°C. Lors de traitements de 20 secondes, les réductions décimales ne sont pas significativement plus importantes, l'incertitude sur les mesures dépassant parfois 1,5 log, mais elles atteignent malgré tout 2,7 et 2 log respectivement. Ces niveaux de décontamination, bien que satisfaisants, sont inférieurs à ce qu'avaient prévu les auteurs, qui préconisent la réalisation de véritables cinétiques de décontamination, les plus complètes possibles, afin de pouvoir analyser l'effet des différents facteurs du traitement. C'est ce qui a été réalisé par Mc Cann *et al.* (2006b) dans le cadre du projet Européen BUGDEATH.

Dans cette étude, des disques de poitrines de poulet avec peau de 5 mm de diamètre, inoculés avec des suspensions de *Escherichia coli* O157:H7 et de *Salmonella* Typhimurium DT104 ont été soumis durant 5 à 60 seconde à un jet de vapeur de température 100°C. Afin d'assurer un traitement homogène de la surface de l'échantillon, la largeur de la buse de vapeur et la distance entre la buse et l'échantillon étaient choisies de manière à placer la surface de l'échantillon dans une zone du jet parfaitement stable. Les résultats obtenus pour *Escherichia coli* O157:H7 et *Salmonella* Typhimurium DT104 sont représentés Figure 5 et Figure 6. Ils montrent que *Escherichia coli* est beaucoup plus résistante que *Salmonella* Typhimurium, avec des réductions décimales après 30 secondes de traitement de 3,51 et 5,32 log respectivement. Cette étude met en évidence un phénomène de traînée. Dans les

premiers instants du traitement, la concentration bactérienne décroît de manière exponentielle, mais rapidement (surtout pour *E. coli*), la destruction bactérienne ralentit, et la concentration bactérienne se stabilise. Il subsiste ainsi une population bactérienne qui résiste au traitement (aux alentours de 4 log UFC·cm⁻² pour *E. coli* et 1 log UFC·cm⁻² pour *Salmonella* Typhimurium), ce qui avait déjà été observé en milieu liquide, mais pour des températures de traitement bien inférieures, de l'ordre de 60°C (Humpheson *et al.* 1997). L'évolution de la population peut globalement être décrite par la corrélation suivante (Eqn 3) :

$$Y = A + B \cdot R^t \quad \text{Eqn 3}$$

Y étant le logarithme de la population, t le temps et A, B et R des constantes à ajuster pour décrire les résultats. Les valeurs proposées par McCann *et al.* (2006b) et qui correspondent aux courbes en trait plein sur les Figure 5 et Figure 6 sont données dans le Tableau 6

Les points expérimentaux représentés par McCann *et al.* (2006b) sur les Figure 5 et Figure 6 sont des moyennes de triplicats calculées en éliminant les éventuels « points aberrants ». Malgré cela, la dispersion de ces valeurs moyennes reste importante, ce qui montre la nécessité de réaliser de nombreuses répétitions des essais pour pouvoir obtenir des résultats exploitables même quand les conditions thermiques sont a priori bien contrôlées.

La présence d'une sous-population plus résistante au traitement thermique a également été observée sur la flore indigène naturellement présente à la surface de carcasses de volailles. Lors du traitement de carcasses entières de poulet dans un flux de vapeur à 96-100°C, Avens *et al.* (2002) constatent une réduction de la flore totale aérobie mésophile de 2,5 log dans les 30 premières secondes du traitement. Puis, entre 30 secondes et 8 minutes de traitement, la concentration bactérienne à la surface de la peau ne diminue pas de manière significative, mais se maintient à des niveaux de l'ordre de 0,8 log UFC·cm⁻² (Figure 7). Cette

valeur étant proche du seuil de détection, il est regrettable que les auteurs se soient limités à deux répétitions seulement pour les durées de traitement les plus longues.

III.3.3 Traitement par la vapeur - température de surface supérieure à 100°C

Il existe deux techniques permettant de réaliser des traitements avec de la vapeur à une température supérieure à 100°C. La première consiste à placer le produit dans une enceinte fermée et de le soumettre à de la vapeur sous pression, qui est alors saturée. La deuxième technique consiste à produire de la vapeur à pression atmosphérique (température voisine de 100°C), puis à surchauffer cette vapeur avant qu'elle n'entre en contact avec le produit qui est alors soumis à de la vapeur sur saturée dit «vapeur sèche».

a. Vapeur sous pression supérieure à la pression atmosphérique

Cette technique a été étudiée en particulier par Morgan *et al.* (1996b) qui considèrent que pour éviter la cuisson, la vapeur doit condenser rapidement en surface au début du traitement et s'évaporer à nouveau rapidement à la fin du traitement. Cette évaporation est réalisée par « flash-détente » des condensats ce qui permet de refroidir très rapidement la surface du produit. Le principe du traitement consiste à placer le produit dans une chambre rotative qui est mise en contact dans un premier temps avec une chambre sous vide (2 kPa) ce qui permet d'éliminer les gaz incondensables présents autour du produit et qui risquent de ralentir la condensation de la vapeur et donc les transferts thermiques (Figure 8). La chambre rotative est ensuite mise en contact avec une chambre contenant de la vapeur sous une pression de 5-6 bars (température réglable de 130 à 140 °C) qui condense à la surface du produit. Finalement, la chambre rotative est connectée de nouveau avec la chambre sous vide, ce qui permet de réaliser la « flash-détente » et l'évaporation des condensats. L'eau condensée qui s'évapore, abaisse rapidement la température de la surface du produit. Le cycle, qui dure au total 1 à 2 secondes, peut être répété afin d'augmenter l'efficacité du traitement. Des réductions décimales de la concentration en *Listeria innocua* à la surface de filets de poulet de 3,9 log après 40 cycles de 52 ms auraient été obtenus dans un tel appareil

en utilisant de la vapeur à 139°C (Morgan *et al.* 1996a). Ces résultats, obtenus sur un prototype de laboratoire, n'ont pas été confirmés par la suite.

Le dispositif utilisé présentant certains défauts d'étanchéité au niveau des pièces mobiles, le principe du traitement a été repris par Kozempel *et al.* (2000; 2001a) dans un système automatisé (VSV : Vacuum Steam Vacuum), qui a fait l'objet d'un brevet. Dans cet appareil, les produits à traiter sont placés dans une enceinte hermétique mise en communication avec un réservoir sous vide (70 mbar, durant 10 ms) puis avec un réservoir contenant de la vapeur sous pression (température réglable entre 130 et 145°C, durant 5 à 10 ms) et à nouveau avec le réservoir sous vide pour refroidir le produit. De la même manière, le cycle peut être répété. Sur des carcasses de volailles, ce système avait été initialement présenté comme pouvant détruire 99,99% des bactéries (Morgan *et al.* 1996a), en utilisant de la vapeur à 145°C, et pouvant travailler à des cadences élevées (70 poulets/min). Cependant, des essais ultérieurs sur des carcasses de poulet entières se sont avérés décevants, puisque des traitements à 138°C durant 20 ms avec ce dispositif n'entraînent des réductions de *Listeria innocua* que de l'ordre de 0,7 à 1,3 log (Kozempel *et al.* 2001a). Ces résultats semblent être assez spécifiques de la surface des volailles, puisqu'une utilisation du même dispositif sur du poisson permet d'obtenir des réductions de *Listeria* de l'ordre de 2 log (Kozempel *et al.* 2001b).

b. Utilisation de vapeur surchauffée

L'utilisation de vapeur sous pression présente l'inconvénient d'imposer des normes de sécurité strictes et conduit à des installations chères et complexes. La vapeur surchauffée permet de s'affranchir de ces inconvénients.

La vapeur saturée peut être produite à des pressions supérieures à la pression atmosphérique (5-7 bars soit 130-150°C) puis détendue dans un dispositif permettant d'en augmenter la température (généralement un tube entouré de résistances électriques). On obtient ainsi une vapeur non saturée, à une température supérieure à 100°C.

L'utilisation de la vapeur surchauffée a été particulièrement étudiée à l'INRA de Theix où un banc a été construit pour appliquer des traitements thermiques avec comme triple objectif

de contrôler précisément la température du jet de vapeur, de suivre en continu la température de la surface du produit traité et d'assurer son refroidissement rapide à la fin du traitement. La calibration de la mesure de la température de surface et l'analyse des transferts ont donné lieu à un travail spécifique (Kondjoyan et Portanguen, 2008b). Dans un premier temps, la vapeur d'eau contenue dans la vapeur surchauffée condense à la surface du produit, formant un film de condensats et transférant sa chaleur latente de changement d'état à la surface du produit. Puis les condensats soumis au jet de vapeur s'évaporent progressivement. Pendant cette phase d'évaporation des condensats, la température de la surface du produit reste constante et égale à la température d'ébullition de l'eau, tandis que la température à l'intérieur du produit augmente par conduction. Une fois que le film de condensats est entièrement évaporé, la température de surface augmente progressivement par convection jusqu'à atteindre la température de la vapeur surchauffée. Dans cette dernière phase, le mécanisme du transfert de chaleur est le même que lors d'un traitement convectif par de l'air chaud. Un modèle a été développé pour décrire l'évolution des températures dans et en surface du produit pendant ces trois phases de traitement par de la vapeur surchauffée.

La durée des différentes phases de chauffage (condensation, évaporation du film de condensats, chauffage par convection du produit) dépend du produit traité et de la température de la vapeur surchauffée qui fixe son humidité relative. Pour la peau de poulet, l'évolution de la température de surface au cours du temps pour différentes températures de vapeur est représentée sur la Figure 9. Il est ainsi possible de distinguer une première phase, de 0,7 à 1 seconde pendant laquelle se forme les condensats à la surface du produit et où la température de surface augmente de 20°C à la température d'ébullition de l'eau (98°C à l'altitude à laquelle ont été réalisés les essais), puis une seconde phase durant laquelle les condensats s'évaporent et où la température de surface reste constante et égale à 98°C. Au cours de la troisième phase, les condensats s'étant entièrement évaporés, la surface du produit est chauffée par convection et la température de surface augmente constamment. Cette phase n'est pas visible pendant les traitements de durée inférieure à 1 minute et lorsque la température de surchauffe de la vapeur est faible (150-160°C) car les condensats n'ont alors pas eu le temps de s'évaporer.

Les variations irrégulières de la température de surface qui peuvent être observées pendant la phase de convection correspondent à des phénomènes de cuisson de la peau de poulet et à des modifications de ses propriétés thermiques. La quatrième et dernière phase correspond au refroidissement du produit avec une diminution rapide de sa température de surface.

L'efficacité des traitements par de la vapeur surchauffée a été évaluée sur des peaux de poulets inoculées avec *Listeria innocua* CLIP 20-595. Cette souche non pathogène a été choisie pour son comportement physiologique proche de celui de *Listeria monocytogenes* lors d'expériences de croissance (Begot *et al.* 1997). Les expériences ont été répétées au moins 10 fois pour chaque point de fonctionnement afin d'obtenir des résultats exploitables. Les peaux de poulets inoculées ont été soumises à des jets de vapeur dont la température était égale soit à 160°C soit à 400°C-500°C et pendant des durées comprises entre 10 s et 45 ou 60 s. Parallèlement aux essais microbiologiques, dont les résultats sont présentés sur la Figure 10, le degré de cuisson de muscles de poulets protégés par la peau et soumis à ces traitements thermiques a été évalué (Kondjoyan et Portanguen, 2008a). Avec une température de surface de 96 ± 2 °C (température de la vapeur : 160 à 180°C), la réduction du nombre de *Listeria innocua* était de $2,3 \pm 1,1$ log UFC·cm⁻² après 10 secondes de traitement, et de 3,1 et 1,3 log UFC·cm⁻² respectivement après 20 et 60 secondes de traitement. Dans le cas de l'utilisation de jets de vapeur surchauffée entre 400 et 450°C, la température de la surface augmentait de manière régulière tout au long du traitement, pour atteindre 218 à 240°C à la fin de l'expérience. La réduction décimale observée après 10 secondes de traitement n'était pas significativement différente de celle observée pour un traitement de même durée avec une température de vapeur plus faible et une température de surface de 96°C. Pour des durées de traitement supérieures à 10 secondes, en revanche, la réduction décimale était significativement plus élevée que celle observée pour des températures de surfaces de 96°C. Un phénomène de traînée a été observé dans le cas des traitements avec une vapeur de température comprise entre 400 et 450°C, identique à celui observé dans le cas des traitements à une température de l'ordre de 100°C (Avens *et al.* 2002; McCann *et al.* 2006b). Malgré tout, il a été possible de définir une zone de

fonctionnement permettant d'assurer des décontaminations de l'ordre de 5 log en moyenne et supérieures à 3 log dans les cas les plus défavorables tout en évitant la cuisson de la viande située sous la peau. Un brevet a été déposé pour protéger ce procédé (brevet N° 05 53451, Novembre 2005, inventeurs A. Kondjoyan et S. Portanguen).

IV. Réponse des bactéries aux traitements de décontamination

Les bactéries, et en particulier les bactéries pathogènes, se trouvent naturellement confrontées à des changements de leur environnement. Elles ont donc acquis des mécanismes d'adaptation susceptibles de les rendre plus résistantes aux chocs et aux stress rencontrés lors des procédés agroalimentaires. Il peut s'agir de réponses générales au stress, ou de réponses plus spécifiques aux traitements acides et thermiques. Lors de la combinaison de stress différents tous ces types de réponses peuvent contribuer à renforcer ou au contraire à affaiblir les bactéries.

IV.1. Réponse générale au stress

Il faut ici distinguer la notion de choc qui désigne l'exposition des bactéries à un stress important et de courte durée. Ainsi, une exposition de plusieurs jours à un pH de 6 est considérée comme un stress à proprement parler alors qu'une exposition de 1 minute à un pH de 2 est considérée comme un choc. La réponse commune des bactéries lorsqu'elles sont exposées à un stress se traduit par la production de protéines appelées facteurs sigma. Le rôle premier des facteurs sigma est de modifier l'affinité de l'ARN polymérase pour certains types de promoteurs, ce qui permet de moduler l'expression de certains gènes. Le facteur sigma principal contrôle ainsi l'expression d'un grand nombre de gènes indispensables à la vie de la cellule (Abee et Wouters, 1999). Les facteurs sigma alternatifs sont plus spécifiques, contrôlant un nombre de gènes plus faible. Ainsi, le facteur sigma alternatif σ^B , intervenant dans la réponse aux stress des bactéries Gram positives, contrôle chez *Bacillus subtilis* certains gènes impliqués dans la réponse au stress énergétique. Chez *Listeria monocytogenes*, ce même facteur σ^B est produit en réponse à une grande variété de stress (osmolarité élevée, températures élevées ou faibles, éthanol, EDTA, froid) et lors de l'entrée en phase stationnaire qui entraîne un stress énergétique (Wemekamp-Kamphuis *et al.* 2004). Chez *Staphylococcus aureus*, σ^B est produit lors de la récupération consécutive à un

choc thermique, en milieu acide et en présence de peroxyde d'hydrogène, mais pas en présence d'éthanol ou lors d'un choc osmotique (Abee et Wouters, 1999). Chez *Escherichia coli*, c'est le facteur sigma alternatif σ^S , codé par le gène *rpoS* et contrôlant plus de 35 gènes différents, qui est exprimé lorsque la quantité de nutriments diminue et lors d'un stress général (Chung *et al.* 2006). Ce même facteur σ^S est exprimé chez *Salmonella* Typhimurium en réponse aux stress osmotiques et acides et lors du passage en phase stationnaire (Bearson *et al.* 1996; McMeechan *et al.* 2007).

IV.2. Réponse des bactéries à un traitement acide

Les bactéries responsables des toxi-infections alimentaires (*Escherichia coli*, *Listeria* spp. *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp.) présentent un pH optimum de croissance proche de la neutralité. Cependant, lors de l'ingestion par l'homme et de leur passage par le tube digestif, elles sont soumises à des conditions de pH extrêmes, à des concentrations en acide chlorhydrique et en acides organiques importantes. Elles disposent donc pour survivre de mécanismes de résistance particulièrement efficaces.

L'effet des acides sur les bactéries a été présenté en détail dans le chapitre II.2 ci-dessus. Rappelons simplement que la baisse du pH du milieu entraîne une dénaturation des protéines membranaires présentes à la surface des bactéries perturbant le transport de nutriments. Lorsque la différence de pH entre le milieu extérieur et l'intérieur de la cellule augmente, la perméabilité de la membrane aux protons augmente, ce qui entraîne une diminution du pH cytoplasmique (Hill *et al.* 1995). Les protéines cytoplasmiques et l'ADN bactérien sont alors dénaturés et le métabolisme de la bactérie fortement perturbé (Cotter et Hill, 2003). Les acides organiques faibles, comme l'acide lactique, peuvent traverser la paroi bactérienne plus facilement lorsqu'ils sont sous leur forme non dissociée. Ils se dissocient alors directement dans le cytoplasme, dont le pH est généralement plus élevé, perturbant le métabolisme bactérien (Alakomi *et al.* 2000). A faible pH, une population bactérienne peut ainsi se diviser en deux sous-populations. Une première population dont le pH cytoplasmique n'est pas assez faible pour que les protéines intracellulaires ne soient dénaturées, et qui seront donc capables de récupérer sans faire appel à la synthèse de protéines particulières. La deuxième sous-population, en revanche, présentera une

dénaturation d'une partie des protéines cytoplasmiques, et nécessitera la synthèse de protéines spécifiques pour pouvoir survivre (Chung *et al.* 2006). En effet, les cellules bactériennes maintiennent leur homéostasie de manière passive, grâce à la perméabilité limitée de leur membrane aux acides dissociés et au pouvoir tampon de leur cytoplasme, mais également de manière active grâce à des pompes à proton (Chung *et al.* 2006; Cotter et Hill, 2003). Une adaptation de la composition en acides gras de la membrane cellulaire a ainsi été observée aux faibles pH chez *E. coli* et d'autres entérobactéries comme *Yersinia enterocolitica*, avec une augmentation de la proportion d'acides gras saturés et dérivés du cyclopropane, induisant une modification de la fluidité membranaire, assurant le maintien du fonctionnement des protéines membranaires. De même, chez *Staphylococcus aureus*, une augmentation de la synthèse d'amino-phospholipides membranaires a été décrite aux faibles pH, augmentant le nombre de charges positives à la surface de la membrane, créant une barrière aux protons. Les macromolécules du cytoplasme (ADN, enzymes) peuvent être protégées par des protéines spécifiques permettant de conserver leur conformation. La bactérie peut également se déplacer physiquement de manière à s'éloigner par chimiotactisme des zones de faible pH. Cette réponse a été décrite notamment chez *Escherichia coli* (Chung *et al.* 2006).

Les mécanismes de la réponse des bactéries aux traitements acides ne sont pas encore pleinement élucidés, mais semblent être associés à la synthèse de protéines spécifiques dont l'expression est induite par l'exposition à un choc ou un stress acide. Ces mécanismes peuvent être séparés en deux grandes catégories, les systèmes de résistance acide (AR, « Acid Response ») et les systèmes de tolérance acide (AT ou ATR, « Acid Tolerance Response »). Le système de résistance acide ne peut être exprimé qu'en présence de composés spécifiques dans le milieu. Ainsi, chez *E. coli*, on distingue une résistance acide AR1 de type oxydatif, exprimée uniquement dans les milieux complexes, où les bactéries peuvent entrer dans un métabolisme oxydatif, contrôlé par le facteur sigma alternatif σ^S et deux résistances acides (AR2 et AR3) qui ne peuvent s'exprimer qu'en présence d'arginine et de glutamate dans le milieu (Chung *et al.* 2006). Les mécanismes des résistances acides reposent probablement sur la synthèse d'amines alcalines capables de réguler le pH intracellulaire (Abee et Wouters, 1999; Chung *et al.* 2006). Ces systèmes de résistance n'ont

pas été retrouvés chez *Salmonella typhimurium* mais des mécanismes similaires nécessitant la présence de lysine et d'ornithine ont été décrits (Abee et Wouters, 1999; Chung *et al.* 2006).

Le système de tolérance acide, en revanche, peut fonctionner lorsque les bactéries sont dans un milieu minimal, soit en phase exponentielle de croissance, soit en phase stationnaire (Lee *et al.* 1994a). Chez *Salmonella typhimurium*, lors de l'exposition à un choc acide, plus de 50 protéines de choc acide (ASP, « Acid Shock Protein ») sont produites lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance et 15 ASP ont été décrites en phase stationnaire (Abee et Wouters, 1999). Au moins 8 de ces protéines, indispensables pour la résistance à l'acide, sont contrôlées par le facteur sigma alternatif σ^S .

En plus de ces mécanismes de réponse spécifiques, des mécanismes de protection généraux sont mis en œuvre, en particulier pour réparer et stabiliser l'ADN (synthèse de RecA, DnaK) et assurer le repliement correct et le bon fonctionnement des protéines (molécules chaperones). Ainsi, lors d'un choc acide la synthèse des protéines chaperones DnaK, GroEL et du facteur sigma alternatif σ^B est augmentée chez *Listeria monocytogenes*, de la même manière que lors d'un choc thermique ou d'une augmentation de la teneur en sel du milieu (Cotter et Hill, 2003; Gandhi et Chikindas, 2007). Une fois induits, ces mécanismes de résistance peuvent rester actifs durant la conservation au froid, parfois jusqu'à 1 mois après l'exposition au stress acide dans le cas de *Escherichia coli* (Lin *et al.* 1996). Ils sont responsables des phénomènes d'adaptation à l'acide fréquemment décrits dans la littérature. Par exemple, l'exposition de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella Typhimurium* durant 5 h à l'acide lactique (pH du milieu 5,5) multiplie par 10 environ leur résistance à un choc acide à pH 3 (Greenacre *et al.* 2003). Les conditions de l'exposition au stress (durée, pH, type d'acide) modifient l'importance de la résistance à un choc acide ultérieur. Cette réponse dépend des pathogènes étudiés. Chez *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 et *Salmonella Typhimurium*, l'augmentation de la résistance aux traitements acides est observée après une adaptation à un stress à des pH de 5,0-6,0 4,0-5,5 et 4,0-5,0 respectivement, l'adaptation étant maximale à pH 5,5 5,0 et 4,5 respectivement (Koutsoumanis et Sofos, 2004). Ce phénomène d'adaptation à l'acide a été bien étudié par plusieurs auteurs (Greenacre *et al.* 2003; Hill *et al.* 1995; Samelis *et al.* 2003).

IV.3. Réponse des bactéries à un traitement thermique

Afin de lutter contre la modification de la fluidité membranaire et la dénaturation des macromolécules (ADN, protéines) lors de l'exposition à un choc ou un stress thermique, les bactéries synthétisent des molécules spécifiques (HSP, Heat Shock Proteins). Certaines HSP sont des molécules chaperones chargées d'assurer le repliement correct des protéines, comme par exemple GroEL, dont la structure est quasiment identique chez toutes les bactéries. D'autres HSP assurent la destruction des protéines non conformes. Certaines, comme DnaK et DnaJ facilitent la transcription de l'ADN et la traduction de l'ARN, en particulier en protégeant les ribosomes. D'autres HSP sont des protéases ATP-dépendantes comme la protéine ClpC de *Listeria monocytogenes* ou ClpP chez *Bacillus subtilis*, chargées de dégrader les protéines non conformes (Abee et Wouters, 1999). Ainsi, chez *Campylobacter jejuni*, plus de 24 HSP différentes ont été identifiées bien que leur rôle ne soit pas toujours connu. Chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, plusieurs facteurs sigma alternatifs sont produits en cas d'exposition à un stress ou un choc thermique (σ^{32} , σ^N , σ^B). En cas de stress extrême (températures supérieures à 42°C), un facteur spécifique, σ^E , appartenant à une classe de facteurs sigma répondant à la dégradation de protéines du périplasme, contrôle l'expression d'une trentaine de gènes assurant la production d'un autre ensemble de protéines (Chung *et al.* 2006). La réponse aux chocs thermiques est rapide. Chez *Escherichia coli*, à 30°C, le niveau d'HSP est faible mais lorsque la température est augmentée à 42°C la concentration en HSP est multipliée par 10 à 15 dans les 5 minutes suivant le choc (Chung *et al.* 2006). A la fin du choc thermique, la concentration en HSP retourne à la normale dans les 20 à 30 minutes. De même, chez *Listeria monocytogenes*, dans les 5 minutes après un choc thermique à 45°C la transcription du gène codant la protéine GroEL est multipliée par 5 dans les 10 minutes.

L'exposition des bactéries à un stress thermique peut ainsi augmenter leur résistance à un choc thermique ultérieur. Ainsi, la résistance d'une culture de *Salmonella typhimurium* face à un choc thermique à 52°C est multipliée par 4 lorsqu'elles ont préalablement été soumises à un stress thermique à 48°C durant 30 minutes (Bunning *et al.* 1990). La durée de la protection acquise après un stress thermique est extrêmement variable selon les micro-

organismes et les conditions du stress (durée et température), et varie entre 1 et 10 heures (Bunning *et al.* 1990).

A notre connaissance, le mécanisme de réponse des bactéries pathogènes à un traitement thermique appliqué dans des conditions réelles (traitement court, mais à une température supérieure à 60°C, de bactéries fixées sur des carcasses) n'a fait l'objet d'aucune étude. Il faut en effet rappeler que les essais présentés ci-dessus ont tous été réalisés en milieu liquide (bouillon nutritif), et les résultats ainsi obtenus ne sont pas directement applicables aux traitements à des températures plus élevées de bactéries fixées sur une surface alimentaire. Cependant, il est probable qu'une partie des mécanismes de réponse des bactéries soit identique dans les deux cas, dans la mesure où les cinétiques de destruction bactérienne sont similaires, même s'il faut appliquer une température de traitement beaucoup plus élevée pour obtenir une même réduction bactérienne lorsque les cellules sont fixées sur une surface.

IV.4. Combinaison de stress

L'exposition des bactéries aux stress les pousse à activer des mécanismes de résistance spécifiques mais également des mécanismes de résistance généraux. Ainsi, une bactérie soumise à un stress A produira des protéines (facteurs sigma alternatifs, HSP) assurant sa protection contre ce stress A mais qui seront également susceptibles de la protéger contre un stress B appliqué ultérieurement. Cette observation vient contredire le principe des « hurdle technologies » qui veut que l'accumulation de stress différents, qui individuellement ne suffiraient pas à éliminer totalement les bactéries, permette d'obtenir une décontamination satisfaisante des produits alimentaires (Hill *et al.* 2001). Nous verrons cependant que ce phénomène de résistances croisées n'est pas systématique, et dépend à la fois des stress appliqués, de leur intensité, de leur ordre d'application et de l'espèce bactérienne considérée.

La simple présence d'une flore de compétition entraîne un stress augmentant généralement la résistance des bactéries pathogènes. Ainsi, la thermorésistance de *Salmonella typhimurium* face à un choc thermique à 55°C est multipliée par 5 en présence de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* et *Pseudomonas fluorescens* à des concentrations supérieures à 8 log UFC·ml⁻¹ (Duffy *et al.* 1995). Inversement, la présence d'une flore de compétition peut augmenter la sensibilité des pathogènes aux traitements, si l'addition des deux stress (compétition et traitement) est trop importante pour les capacités d'adaptation des bactéries. Par exemple, la présence d'une flore naturelle dans les eaux de rinçage de carcasses de bœuf augmente la sensibilité de *Listeria monocytogenes* lors d'une exposition à une solution d'acide lactique à 2% (Samelis *et al.* 2001).

L'exposition au froid (2 h à 4°C) quand à elle, augmente la résistance à l'acide de *Salmonella Typhimurium*, surtout lorsque les cellules sont en phase stationnaire et fixées sur un support (Gawande et Bhagwat, 2002). Elle augmente en revanche la sensibilité aux traitements thermiques, du moins chez *Listeria monocytogenes*, probablement en inhibant la synthèse de certaines HSP (Miller *et al.* 2000). Dans ce dernier cas, la durée de l'exposition au froid (1 à 3 h) semble avoir plus d'importance que son intensité (entre 0 et 15°C).

En ce qui concerne les traitements acides et thermiques, l'exposition à un stress thermique peut augmenter la résistance aux chocs acides. L'effet de traitements thermiques et acides combinés a été beaucoup mieux étudié en milieu liquide. Mais encore une fois, il est probable que les mécanismes de résistance soient les mêmes lorsque les bactéries sont fixées à la surface de produits alimentaires, même si la température des traitements thermiques doit être beaucoup plus élevée pour permettre d'obtenir des réductions bactériennes du même ordre qu'en milieu liquide. Ainsi, la résistance de *E. coli* O157:H7 à un choc acide à pH 2,5 est augmentée 10 à 100 fois après exposition à un stress thermique de 10 min à 48°C en milieu liquide (Wang et Doyle, 1998). Cet effet est probablement lié à deux protéines membranaires, dont la synthèse augmente fortement dans les 10 minutes suivant le stress thermique, et se poursuit au moins 6 h après le stress. Un stress acide, en revanche, n'augmente pas la résistance face à un choc thermique. Chez *Listeria monocytogenes*, toujours en milieu liquide, l'exposition à un stress acide à pH 5 à 6 durant 90 minutes

n'apporte pas de résistance supplémentaire face à un choc thermique à 50°C (Koutsoumanis *et al.* 2003). De même, sur des cellules en phase exponentielle de croissance, un stress thermique à 45°C durant 1 h n'augmente pas la résistance de *Listeria monocytogenes* à un choc acide à pH 3,5 (Lou et Yousef, 1997). La résistance aux chocs est complexe et dépend également de l'intensité du choc final. Après exposition de cultures de *Listeria monocytogenes* à des combinaisons de stress acides, thermiques et osmotiques, la résistance est augmentée face à un choc thermique à 57°C, mais pas face à un choc thermique à 52°C ou 63°C (Skandamis *et al.* 2007).

Sur des carcasses de porc, les flores mésophiles et psychrophiles indigènes sont réduites de 0,7 et 1,3 log respectivement après un traitement par la vapeur (température de la vapeur de 90 à 95°C, durée du traitement estimée à 0,013 s) suivi d'une pulvérisation d'acide lactique à 2% (à 45°C). Après 5 jours de stockage à 4°C, ces réductions sont de 1,5 et 3 log respectivement (Pipek *et al.* 2006). L'efficacité du traitement combiné est significativement plus importante que celle du traitement à la vapeur appliqué seul. Des résultats du même ordre ont été obtenus sur des carcasses de bœuf (Pipek *et al.* 2005). De la même manière, sur du muscle de bœuf inoculé avec *Escherichia coli* et *Salmonella* Typhimurium et traité avec des solutions d'acide acétique à 1, 2 ou 3% appliquées à des températures de 25, 40, 55 ou 70°C, la concentration en acide a une influence prépondérante sur les réductions bactériennes entre 25 et 55°C. A 70°C, en revanche, l'augmentation de la concentration en acide n'accroît pas de manière significative les réductions bactériennes (Anderson et Marshall, 1989). En ce qui concerne l'ordre d'application des traitements, bien que ce facteur n'ait pas d'influence significative selon certains auteurs (Ward *et al.* 2000), la tendance générale semble favorable à l'application du traitement acide après le traitement thermique. Ainsi, lors du traitement de pièces de bœuf inoculées avec *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium, les réductions obtenues lors de l'immersion dans de l'eau chaude (85°C durant 15 s) suivie d'une immersion en solution acide (acide lactique à 1% ou 2%) sont significativement plus élevées que lorsque le traitement acide précède l'immersion dans l'eau chaude (Ozdemir *et al.* 2006). Les réductions immédiates sont ainsi de 0,79 log UFC·g⁻¹ (*Salmonella* spp.) et 0,89 log UFC·g⁻¹ (*Listeria* sp.) pour un traitement à l'eau chaude suivi d'un traitement par l'acide lactique à 1%, contre 0,26 et 0,78

log UFC·g⁻¹ respectivement lorsque l'ordre des traitements est inversé. Après 5 jours de stockage à 4 °C, cette tendance s'accroît pour *Listeria* sp. Ainsi, un traitement à l'eau chaude suivi d'un traitement par l'acide lactique à 2%, entraîne une réduction de la flore de 3,84 log UFC·g⁻¹ tandis qu'elle n'est que de 2,86 log UFC·g⁻¹ si l'ordre des traitements est inversé. Après le rinçage à l'eau des surfaces, il semble donc que l'effet de rémanence des traitements soit moins important.

Un effet de synergie est parfois observé dans la littérature. Après un traitement de 4 minutes par de l'acide lactique 0,2M à 55°C de muscles de bœuf inoculés avec *Escherichia coli* O157:H7, un traitement par de la vapeur sous vide à 80°C durant 10 secondes permet d'obtenir des réductions décimales de l'ordre de 5 log UFC·cm⁻² pour *Escherichia coli* et de 3 log pour *Pseudomonas spp.* L'utilisation d'eau distillée au lieu d'acide lactique (traitement thermique seul) ne permet d'atteindre des réductions que de 3 et 2 log UFC·cm⁻² seulement, ce qui démontre l'effet synergique entre l'acide lactique et le traitement thermique. Dans le cas de *Escherichia coli* cet effet synergique n'est observable que si le temps de traitement est suffisamment long (Ward *et al.* 2000). Un effet synergique similaire a été observé pour inactiver *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella typhimurium*, sur des produits végétaux (purée d'asperges). Le traitement consistait alors à ajouter de l'acide acétique (concentration finale à 0,25% ou 2%), et à porter la température du produit à 60 ou 75°C (Shin *et al.* 2006). La présence d'acide acétique inhibait également la croissance bactérienne au cours du stockage.

Matériel et méthodes

I. Introduction

Sur les carcasses de volaille, la contamination bactérienne est concentrée en surface, en particulier sur la peau, et dans la cavité viscérale, le muscle sous-cutané pouvant être considéré comme stérile chez les animaux en bonne santé. De plus, des études antérieures ont montré que pour les gammes de traitement thermique et acide envisagés, la présence de muscle sous-cutané n'avait pas d'influence significative sur l'efficacité des traitements (Kondjoyan et Portanguen, 2008b ; Van Der Marel *et al.* 1989). De ce fait, les traitements de décontamination, objet de cette étude, sont appliqués uniquement sur la face externe de la peau de poulet, principale volaille consommée à La Réunion.

Lors de leur arrivée à l'abattoir, les volailles présentent une charge en bactéries pathogènes au niveau de la peau variable et généralement faible. Aussi, afin de pouvoir évaluer l'effet de traitements de décontamination efficaces entraînant une réduction de la flore microbienne de plusieurs logarithmes décimaux, les surfaces de volaille étudiées doivent être artificiellement inoculées avec des souches de bactéries connues. Ces surfaces sont ensuite traitées et les bactéries survivantes dénombrées. Le dénombrement s'effectue soit immédiatement après le traitement, soit après une période de stockage qui met en évidence les phénomènes ultérieurs de multiplication bactérienne ou de rémanence du traitement. Comme la contamination initiale peut être légèrement différente d'une inoculation à l'autre, chaque expérience comprend systématiquement la production de témoins inoculés mais non traités qui permettent d'évaluer précisément la réduction bactérienne relative à chacun des traitements. Le schéma de principe des essais est représenté sur la Figure 11.

Dans la première partie de ce travail, une souche de *Listeria* non pathogène, *Listeria innocua* (CLIP 20-595), est utilisée pour des raisons de facilité de manipulation et car son comportement s'apparente à celui de *Listeria monocytogenes*. Les essais sont ensuite

poursuivis avec une autre espèce bactérienne, *Salmonella*, dont la prévalence est majeure dans les élevages de volaille.

L'efficacité de la décontamination peut être rapportée à la masse du produit (réductions décimales exprimées en $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) ou à sa surface (réductions décimales exprimées en $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$). La charge bactérienne des carcasses de volaille étant principalement concentrée sur la peau, il semble plus pertinent de rapporter les concentrations bactériennes et les niveaux de décontamination à la surface du produit. Les résultats de ce travail sont donc toujours exprimés en $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Ceci nécessite le développement de dispositifs spécifiques pour contrôler avec précision la superficie de peau inoculée, traitée et qui fait ensuite l'objet du dénombrement.

Le travail expérimental est principalement réalisé au Cirad de La Réunion mais deux campagnes d'essais sont également effectuées à l'Inra de Theix. Les protocoles appliqués sur chacun de ces sites se différencient légèrement car ils combinent des méthodes et des dispositifs expérimentaux très spécifiques et qui évoluent tout au long de l'étude. Les appareils de traitement thermique utilisés à l'INRA de Theix préexistaient à ce travail de thèse, tandis que la plupart des matériels et méthodes utilisés au CIRAD sont spécifiquement développés dans le cadre de cette étude.

II. Méthodes d'inoculation

II.1. Choix des peaux utilisées

Les essais réalisés au CIRAD-Réunion portent soit sur des peaux congelées, soit sur des peaux fraîches. L'utilisation de peaux congelées se justifie car elle autorise la conduite de plusieurs essais successifs sur un même lot de volailles, diminuant ainsi la variabilité des produits en termes de composition, d'épaisseur et de flore indigène. Ceci rend les essais exploitables avec seulement trois répétitions pour chaque condition expérimentale. Mais la congélation peut modifier les caractéristiques de la peau (déstructuration cellulaire liée à la formation de

cristaux de glace du fait d'une congélation lente), ce qui pourrait nous écarter des conditions industrielles où le traitement de décontamination doit s'appliquer sur des peaux fraîches immédiatement avant la réfrigération des carcasses (« ressuyage »). Toutefois, des essais préliminaires montrent que la congélation n'affecte pas le comportement de la peau vis-à-vis des traitements par les acides, aussi est-elle retenue dans ce cas. Par contre, elle tendrait à augmenter de manière importante l'efficacité des traitements thermiques ultérieurs. Aussi, les traitements thermiques et combinés sont-ils tous réalisés sur des peaux fraîches mais en augmentant significativement le nombre de répétitions (10 réplicats) lié à chaque essai pour intégrer au mieux la variabilité du produit.

II.1.1 Origine et préparation des peaux congelées

Des peaux de poitrine de poulets appartenant tous au même lot (même âge, même alimentation, élevage dans les mêmes locaux, abattage le même jour) sont prélevées à l'abattoir de la société Crête d'Or Entreprise (Z.I. les sables, Etang Salé, La Réunion). Elles sont ensuite séparées individuellement par des feuilles de papier sulfurisé stérile, emballées sous vide par groupes de 10, congelées puis conservées à -18°C jusqu'à leur utilisation. Ces différentes étapes sont conduites le jour de l'abattage.

II.1.2 Origine et préparation des peaux fraîches

Des peaux fraîches provenant de hauts de cuisse sont achetées en grande surface (marque « Ti'Gayer », société Crête d'Or, Z.I. Les Sables, Etang Salé, La Réunion, ou marque Chanfrais, distribué par les enseignes du groupe Auchan). Elles sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation et les essais sont réalisés moins de 5 jours après la date d'abattage (la date limite de consommation étant de 7 jours après l'abattage). Elles sont remises à température ambiante et excisées stérilement moins de 10 minutes avant les essais.

II.1.3 Souches bactériennes utilisées

Les essais de décontamination sont effectués en considérant les trois espèces de bactéries pathogènes qui posent le plus de problèmes à la filière volaille, *Listeria*, *Salmonella* et *Campylobacter*.

La souche de *Listeria innocua* utilisée (*Listeria innocua* CIP 20-595) est choisie pour sa cinétique de croissance proche de celle de *Listeria monocytogenes* (Begot *et al.* 1997). Le côté non pathogène de cette souche permet de conduire des essais de décontamination menés en atmosphère libre. Ceci s'avère particulièrement important lors des essais de traitement thermique et combiné réalisés à l'INRA de Theix, où les peaux inoculées sont soumises à des jets de vapeur et d'air assez forts, risquant de former des aérosols susceptibles de contaminer l'environnement et le personnel.

La souche de *Salmonella* choisie, *Salmonella enterica* subsp *enterica* sérovar Enteritidis CIP 82.97 (désignée par la suite par *Salmonella* Enteritidis), est la souche de référence pour le sérovar Enteritidis. De même, la souche de *Campylobacter* choisie, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* CIP 103726, est utilisée pour le contrôle qualité de certains tests de détection. Ces deux souches pathogènes ont été isolées en milieu clinique, preuve de leur caractère pathogène pour l'homme.

Les souches bactériennes, provenant des collections de l'Institut Pasteur, sont conservées à -18°C sur cryobilles en milieu glycérolé. Cette méthode de conservation est choisie pour diminuer autant que possible le nombre de mises en culture successives, susceptibles de modifier le comportement des bactéries. De plus, chaque essai peut ainsi être réalisé avec des bactéries dans des états physiologiques semblables.

L'étude de la décontamination de peau inoculée par *Salmonella* Enteritidis se heurte à un doute sur l'identification précise de la souche utilisée. Ce sérovar est normalement très mobile et forme sur le milieu MSRV des colonies blanches entourées d'un halo lié à la diffusion des bactéries. La souche utilisée pour les essais présente bien les caractéristiques de *Salmonella enterica* subsp *enterica* mais se visualise sur milieu MSRV comme une colonie blanche sans diffusion. La souche a été envoyée au Laboratoire Vétérinaire Départemental pour analyse et a été identifiée comme *Salmonella enterica* subsp *enterica*, mais

l'identification du sérovar s'est avérée impossible. Différentes explications peuvent être avancées :

- La souche reçue ne correspond pas à la souche commandée
- Lors de la revivification de la souche lyophilisée, ou lors de la réalisation des cryotubes, la souche a été contaminée par une autre souche de *Salmonella*.
- La souche correspond bien à *Salmonella* Enteritidis mais aurait perdu sa mobilité lors du transport ou lors de la conservation en cryotubes.

La souche ayant été commandée à l'Institut Pasteur, qui dispose d'une bonne réputation et d'une solide expérience, il est peu probable que le problème vienne de ce fournisseur bien qu'une erreur soit toujours possible. Lors de la revivification de la souche et des repiquages liés à la réalisation des cryotubes, un soin particulier est apporté aux conditions d'hygiène et d'asepsie afin d'éviter justement toute contamination. Par ailleurs, l'analyse des cryotubes utilisés montre qu'ils ne contiennent que des *Salmonella enterica* subsp *enterica*. Si une contamination s'était produite, ils contiendraient certainement d'autres espèces bactériennes, comme des coliformes ou des streptocoques. L'hypothèse privilégiée est donc une perte de la mobilité de la souche de *Salmonella* Enteritidis utilisée, soit au cours du transport, soit lors de la conservation. Le laboratoire de microbiologie ayant subi plusieurs coupures de courant de longue durée non planifiée, parfois durant les week-ends, il est possible que les bactéries aient souffert de décongélations et congélations successives, modifiant leurs caractéristiques physiologiques.

Le manque de temps rendant impossible la commande d'une nouvelle souche et la répétition des essais, nous partons sur l'hypothèse que les bactéries utilisées correspondent à une souche de *Salmonella* Enteritidis ayant perdu sa mobilité.

De même, l'étude de la décontamination de peaux inoculées par *Campylobacter jejuni* se heurte à des difficultés de mise en culture, malgré des milieux spécifiquement formulés à cet effet, et de dégénérescence de la souche en forme non cultivable. Les résultats obtenus n'étant pas exploitables, ils ne seront pas exposés. Certains essais étant réalisés en inoculant les peaux avec un mélange de *Listeria innocua*, *Salmonella* Enteritidis et *Campylobacter*

jejuni, les protocoles de mise en culture, d'inoculation et de dénombrement de *C. jejuni* sont exposés dans les parties II.2 et V.2 ci-dessous.

II.2. Préparation de la solution d'inoculation

Les peaux de poulet sont inoculées à partir d'une suspension bactérienne désignée par la suite sous le terme de « solution d'inoculation ».

Dans le cas des essais réalisés au CIRAD-Réunion, pour chaque souche bactérienne, un erlen de 500 ml contenant 300 ml de milieu nutritif (bouillon nutritif, Biokar Diagnostics, France pour *Listeria innocua* et *Salmonella* Enteritidis, bouillon Preston, Oxoid, France pour *Campylobacter jejuni*) est inoculé avec deux à cinq cryobilles de la souche considérée. L'erlen inoculé est mis à incuber sous agitation (100 rpm) à 37°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance (24 h pour *Listeria innocua*, 48 h pour *Salmonella* Enteritidis et 18h en anaérobiose pour *Campylobacter jejuni*). Des essais préliminaires permettent de déterminer la durée d'incubation nécessaire pour atteindre la phase stationnaire de croissance pour chaque souche (Figure 12 et Figure 13).

La suspension bactérienne est ensuite centrifugée (5000 g durant 15 minutes), et le culot remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile (9g de NaCl par litre). La densité optique à 600 nm de la suspension est ajustée de manière à obtenir une solution d'inoculation ayant une concentration bactérienne constante. Ainsi, dans les essais utilisant uniquement *Listeria innocua*, la DO_{600} est ajustée à $0,20 \pm 0,02$ unités de manière à obtenir une solution d'inoculation à $8,00 \pm 0,3 \log \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$. Lors des essais utilisant uniquement *Salmonella* Enteritidis, la DO_{600} est fixée à $2,00 \pm 0,10$ unités de manière à obtenir une solution d'inoculation à $9,06 \pm 0,3 \log \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$. Dans le cas de l'inoculation avec un mélange de *Listeria innocua*, *Salmonella* Enteritidis, et *Campylobacter jejuni*, les trois cultures bactériennes sont centrifugées séparément. Les culots résultants sont remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile et leur densité optique à 600 nm est ajustée à $0,6 \pm 0,02$ unités. Des volumes identiques de chacune des trois suspensions sont mélangés

soigneusement de manière à obtenir une solution d'inoculation présentant des concentrations de $7,5 \pm 1 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ pour chaque espèce bactérienne.

La concentration bactérienne de la solution d'inoculation est vérifiée systématiquement en réalisant des dilutions décimales étalées sur des boîtes de milieu Oxford pour *Listeria innocua* (Biokar diagnostics, France), XLD pour *Salmonella* Enteritidis (Xylose-Lysine-Désoxycholate, Oxoid, France), Karmali et Butzler pour *Campylobacter jejuni* (gélose karmali et gélose Butzler, Oxoid, France). Les boîtes incubent à 37°C, 24 à 48 h (en anaérobiose pour *C. jejuni*) avant lecture.

Pour les essais réalisés à l'INRA de Theix, la souche de *Listeria innocua* CLIP 20-595, conservée sur cryobilles à -18°C en milieu glycérolé, est tout d'abord transférée sur des tubes de gélose TSA (Trypticase Soy Agar, Difco, USA) incubés 8h à 37°C. Deux oeses de la culture ainsi obtenue sont ensuite transférées dans 100 ml de milieu viande constitué de 10 g.l⁻¹ de peptones de viande (Merck, Allemagne), 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure (Difco, USA) et 5 g.l⁻¹ de glucose (Prolabo, France) et mis à incuber 20 h à 20°C. La solution d'inoculation ainsi obtenue est utilisée directement pour inoculer les surfaces de peaux de volailles sans aucune étape de centrifugation et de remise en suspension. Des essais préliminaires montrent que les bactéries se trouvent alors en phase stationnaire de croissance. La concentration finale en *Listeria innocua* est de $9,29 \pm 0,3 \log \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$. La concentration bactérienne de la solution d'inoculation est systématiquement vérifiée en réalisant des dilutions décimales étalées sur des boîtes de milieu PALCAM (Merck, Allemagne).

II.3. Dispositifs d'inoculation

Les dispositifs d'inoculation utilisés lors des essais réalisés au CIRAD de la Réunion et à l'INRA de Theix visent à assurer une inoculation homogène d'une superficie connue de la face externe de peaux de poulets. Ils présentent cependant des spécificités liées au traitement visé pour l'application d'un traitement acide dans le cas du matériel utilisé au CIRAD, et d'un traitement thermique pour les essais menés à l'INRA de Theix.

II.3.1 Dispositif utilisé au CIRAD-Réunion

Dans le cas des essais de décontamination acide réalisés au CIRAD-Réunion, la peau de poulet est positionnée sur une feuille de papier sulfurisé stérile. L'ensemble est placé sur un support rigide en PTFE (Téflon®). Une coupelle en acier inoxydable, de diamètre interne 44,6 mm est disposée sur la peau, et le tout est maintenu solidaire grâce à un système de serre-joints (Figure 14). Deux orifices percés au sommet de la coupelle en acier permettent le remplissage et la vidange rapide de la coupelle. Un volume de 10 ml de solution d'inoculation est versé dans la coupelle et mis en contact avec la surface de la peau délimitée par la coupelle. Après 2h de contact avec la peau à température ambiante, la solution d'inoculation est éliminée, la coupelle remplie avec 25 ml d'eau physiologique, bouchée à l'aide de bouchons en silicone stériles et agitée vigoureusement, puis l'eau physiologique est éliminée. Cette opération est répétée de manière à rincer soigneusement la surface à six reprises, afin de ne conserver que les bactéries fortement fixées à la surface de la peau.

Pour les essais de cinétique de décontamination et de traitement combiné au CIRAD-Réunion, la peau (placée sur une feuille de papier sulfurisé stérile) est tout d'abord placée dans un porte-échantillon en acier inoxydable constitué d'une base pleine et d'un système de fixation percé d'un trou de diamètre légèrement supérieur à la coupelle d'acier inoxydable utilisée pour délimiter la zone de peau inoculée (Figure 15). L'ensemble est ensuite disposé sur le support en PTFE, et une coupelle en acier de 44,6 mm de diamètre interne est placée sur la peau. Le tout est maintenu solidaire de la même manière que décrit précédemment (Fig. 14). Un volume de 10 ml de solution d'inoculation est versé dans la coupelle. Après 1 minute de contact avec la peau à température ambiante, la solution d'inoculation est éliminée et la peau est laissée 10 minutes, toujours à température ambiante, pour permettre la fixation des bactéries et le séchage de la surface.

II.3.2 Dispositif utilisé à l'INRA de Theix

Dans le cas des essais de décontamination acide, thermique et combinée réalisés à l'INRA de Theix, la solution d'inoculation est versée dans un cristalliseur de manière à affleurer la surface d'une grille en PTFE placée dans ce cristalliseur. Un disque de peau de 60 mm de diamètre environ est fixé sur une cale en PTFE. La peau et la cale sont placées sur la grille de manière à ce qu'un disque de 50 mm de diamètre soit placé en contact avec la solution d'inoculation. Après 1 minute de contact, la peau est positionnée sur une autre grille en PTFE et laissée 10 minutes à température ambiante pour permettre la fixation des bactéries et le séchage de la surface.

III. Dispositif de traitement acide

Les solutions de décontamination sont préparées en mélangeant stérilement une solution d'acide lactique à une concentration de 90% (VWR International, France) et de l'eau stérile de manière à obtenir des solutions d'acide lactique à 2, 5 et 10% v/v.

Dans le cas des essais de traitement acide seul, la peau est laissée dans le dispositif d'inoculation/traitement décrit plus haut, dans lequel 25 ml de solution d'acide lactique sont versés. La peau est ainsi mise en contact avec la solution d'acide lactique durant un temps donné (généralement 1 minute ou 30 minutes).

Pour les essais de traitement combiné (traitement thermique suivi d'un traitement acide), la peau, toujours fixée sur son support (cale en PTFE dans le cas des essais à l'INRA, porte-échantillon en acier inoxydable dans le cas des essais au CIRAD), est placée sur un support rigide en PTFE et recouverte d'une coupelle en acier inoxydable, de la même manière que lors des essais de traitement acide seul. L'ensemble étant maintenu solidaire grâce à un système de serre-joints, 25 ml de solution d'acide sont versés dans la coupelle et laissés en contact avec la peau durant un temps donné.

Dans les deux cas (traitement acide seul ou traitement combiné), la solution d'acide lactique est éliminée à l'issue du traitement. Aucun rinçage des peaux n'est effectué afin d'évaluer

d'éventuels effets de rémanence pendant la période de stockage réfrigéré postérieure au traitement par l'acide.

IV. Traitement thermique

IV.1. INRA

Le dispositif utilisé lors des essais de traitement thermique menés à l'INRA de Theix repose sur l'utilisation d'un jet de vapeur surchauffée (Kondjoyan et Portanguen, 2008b). De la vapeur à 150-165°C produite, sous 5-6 bars de pression, par un générateur (Politi, France) passe dans un tube en acier inoxydable entouré de deux résistances chauffantes de 1 kW et isolé de l'air ambiant par une épaisseur de 10 cm de laine de roche. La température du tube est contrôlée par l'intermédiaire d'un régulateur PID ce qui permet, en théorie, de surchauffer la vapeur jusqu'à des températures de 500°C. Dès la sortie du tube, la vapeur se mélange avec l'air ambiant et se refroidit. La hauteur du porte-échantillon localisé à l'aplomb de la sortie du tube est réglable, ce qui permet de contrôler précisément la distance entre la sortie du tube et la surface de la peau.

Les essais sont effectués sur des temps inférieurs ou égaux à une minute et avec des températures inférieures à 100°C en surface des échantillons. Pour obtenir ces conditions, la vapeur n'est quasiment pas surchauffée dans le tube d'amenée mais maintenue au voisinage de sa température d'émission (150°C-180°C).

Dans une première série d'essais, la distance entre la sortie du tube et le porte échantillon est fixée à 43 mm. Dans ces conditions, la température en surface de l'échantillon augmente brusquement (en moins d'une seconde) jusqu'à la température d'ébullition de l'eau (96°C-98°C à Theix) où elle reste constante jusqu'à la fin de l'expérience.

Dans une seconde série d'essais, la distance entre la peau et le porte-échantillon est augmentée, de manière à accroître la quantité d'air froid mélangé à la vapeur surchauffée (Figure 16). Dans ce cas, la température de surface augmente pour atteindre une valeur de 70°C puis reste constante jusqu'à la fin de l'expérience. La rampe de température de surface

est plus lente que dans le cas précédent où la vapeur était quasiment pure (faible proportion d'air dans le mélange).

Une fois la distance entre la sortie du tube et le porte échantillon réglée, la peau de poulet est fixée sur une cale en Teflon (PTFE) est placée sur le porte-échantillon lui-même fixé sur un rail. En couissant sur le rail, le porte-échantillon peut être placé successivement dans une zone de chargement, sous le jet de vapeur, puis sous un jet d'air de température égale à 4°C (vitesse 20 m·s⁻¹) produit par un tube de Ranque-Hilsch, ce qui permet de refroidir rapidement la surface (Figure 16). Les trois positions successives sont parfaitement repérées grâce à des butées à billes. L'ensemble du dispositif est laissé en chauffe durant 2 heures avant le début des essais afin d'assurer sa mise à l'équilibre thermique.

La température du jet impactant l'échantillon est mesurée par un thermocouple de type K de 0,5 mm d'épaisseur placé au centre de l'échantillon et à 2 mm au-dessus de la surface de la peau de poulet. La température en surface de la peau est mesurée à l'aide d'un pyromètre à infrarouge solidaire du porte-échantillon et dans une région de 2 cm de diamètre située au centre de l'échantillon.

Des études antérieures menées sur ce dispositif montrent qu'une augmentation de l'épaisseur de la peau de poulet tend à diminuer la température maximale obtenue en surface de la peau et donc l'efficacité de la décontamination thermique. Cet effet est observé dans le cas de traitements thermiques courts (10 s) réalisés à des températures de vapeur surchauffée très élevées (400-450 °C) (Kondjoyan and Portanguen, 2008 ab). Les épaisseurs de peaux de poulets soumises aux traitements thermiques sont donc systématiquement mesurées lors des premiers essais que nous avons effectués à l'INRA de Theix. Les épaisseurs de peaux variant peu et aucun effet sur la décontamination n'étant apparemment observé pour nos conditions de traitements (températures inférieures à 100°C), l'épaisseur de la peau n'est plus mesurée par la suite lors des essais réalisés au CIRAD-Réunion.

Le dispositif existant à l'INRA de Theix ne permet pas de travailler avec des bactéries pathogènes du fait de ses dimensions et de sa conception « ouverte ». Un pilote de laboratoire de dimensions plus réduites est donc conçu, réalisé dans le cadre de ce travail et utilisé lors des essais de traitement thermique et combiné au CIRAD-Réunion.

IV.2. Dispositif utilisé au CIRAD-Réunion

Ce dispositif repose sur le principe de la « cloche à vapeur ». Il est conçu de manière à être suffisamment compact pour pouvoir être placé dans un poste de sécurité microbiologique. De la vapeur à pression ambiante est produite par un générateur de vapeur (Philips, France) à 100°C. La vapeur est introduite dans une enceinte fermée via un tube de surchauffe en acier inoxydable entouré d'une résistance chauffante régulée. L'enceinte, isolée avec de la laine de roche, est entourée de deux résistances chauffantes régulées. Les résistances du tube de surchauffe et de l'enceinte permettent d'augmenter la température de la vapeur mais ne sont utilisées dans cette étude que pour éviter la condensation dans l'enceinte. Le surplus de vapeur et les condensats éventuels sont évacués et barbotent dans un erlen de 2 litres contenant une substance bactéricide afin d'éviter toute contamination de l'air ambiant par des bactéries pathogènes (Figure 17). A la fin des essais, les résistances du tube de surchauffe et de l'enceinte sont portées à 200°C et le générateur de vapeur réglé sur son débit maximal afin d'assurer la stérilisation du pilote. L'ensemble du pilote est laissé en fonctionnement durant 2 h avant le début des essais et 45 minutes entre chaque essai afin d'assurer sa mise à l'équilibre.

Le porte-échantillon en acier inoxydable sur lequel est fixé la peau de poulet est placé dans un tiroir et sa température contrôlée sommairement grâce à un thermocouple de type K placé à sa surface. Lors de la fermeture du tiroir, la surface de la peau est instantanément mise en contact avec de la vapeur à 100°C. A la fin du traitement, le tiroir est ouvert et la peau refroidie par un jet d'air à 20°C jusqu'à ce que sa température chute sous le seuil des 35°C.

Lors de la conception de ce dispositif, un soin particulier a été apporté afin d'éviter la formation de condensats sur les parois de l'enceinte et leur projection sur l'échantillon. L'épaisseur de la couche de laine de roche entourant les parois permet d'assurer une isolation efficace, l'habillage de l'appareil ne dépassant pas 40°C même lors de la stérilisation de l'enceinte où la température intérieure est portée à 200°C. L'ensemble de l'appareil a été conçu de manière à éviter au maximum les ponts thermiques, et l'utilisation d'une résistance dédiée maintient les parois à une température légèrement supérieure au point de rosée. De même, la paroi de l'enceinte située au-dessus de l'échantillon présente une forte inclinaison afin que les éventuelles gouttes de condensats s'écoulent le long des parois et ne risquent pas de tomber sur l'échantillon. Le tiroir porte-objet, aussi petit que possible, est pourvu de joints assurant l'étanchéité de l'enceinte lorsqu'il est en position ouverte et en position fermée afin de minimiser l'entrée d'air froid dans l'enceinte et les fuites de vapeur. Toujours pour éviter l'entrée d'air froid, l'intérieur de l'enceinte est maintenu en très légère surpression. De plus, lors de la mise en route, l'ensemble de l'appareil est tout d'abord porté à une température légèrement supérieure à 100°C avant que la vapeur ne soit produite de manière à éviter une forte condensation sur les parois de l'enceinte lors de l'admission de la vapeur.

V. Méthodes de dénombrement des microorganismes

Après l'inoculation (pour les témoins non traités) ou à la fin du traitement (pour les peaux traitées), les bactéries survivantes sont dénombrées soit immédiatement, soit après 7 jours de stockage. Dans ce dernier cas, la peau est placée dans une boîte de Petri stérile, scellée avec du parafilm (Grosseron, France), et stockée à $4 \pm 0,5$ °C. Les concentrations bactériennes sont exprimées en $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. Pour des raisons pratiques, dans la suite du texte, le dénombrement des bactéries immédiatement après traitement et le dénombrement après 7 jours de conservation sont désignés respectivement par « dénombrement à T0 » et « dénombrement à T7 ».

V.1. Protocole appliqué à l'INRA

Un disque de 3,50 cm² de superficie, correspondant à la zone centrale de l'échantillon où est effectuée la mesure de température, est découpé stérilement dans la peau et broyé au stomacher dans 35 ml d'eau peptonnée tamponnée (Biokar Diagnostics, France). Les échantillons sont dilués dans de l'eau physiologique stérile et étalés immédiatement sur des boîtes de gélose PALCAM (Merck KGaA, Allemagne) en utilisant un ensemenceur spiral. Afin d'abaisser au maximum le seuil de détection, des ensemencements en profondeur sont également réalisés à partir de 1 ml de l'échantillon non dilué (dilution 0). Les boîtes sont incubées à 37°C durant 24 à 48 h. Dans ce cas, le seuil de détection est évalué comme étant égal à 1 log UFC·cm⁻².

V.2. Protocole appliqué au CIRAD

Un disque de 7,35 cm² de diamètre est découpé stérilement dans la peau et broyé au stomacher dans 25 ml d'eau peptonnée tamponnée (Biokar Diagnostics, France). Dans le cas des essais avec *Listeria innocua* traité par l'acide seul, les échantillons sont dilués dans de l'eau physiologique stérile et étalés immédiatement sur des boîtes de gélose OXFORD (Merck KGaA, Allemagne). Les boîtes sont incubées à 37°C durant 24 à 48 h. Le seuil de détection a alors été évalué comme étant égal à 1,67 log UFC·cm⁻².

Dans le cas des essais de traitement acide, thermique ou combiné réalisés sur *Salmonella* Enteritidis, ainsi que pour l'étude de la cinétique de décontamination acide sur *Listeria innocua*, *Salmonella* Enteritidis et *Campylobacter jejuni*, une technique originale dérivée de la méthode du MPN (Most Probable Number) est utilisée afin de diminuer autant que possible le seuil de détection (Figure 18). Pour chaque peau, après broyage, six séries de dilutions sont réalisées dans une plaque à puits (Plaques Deepwell, Eppendorf, USA), chaque puit contenant 0,9 ml de bouillon nutritif (bouillon Preston pour *C. jejuni*). Les plaques sont mises à incuber à 37°C durant 24 h (en anaérobiose pour *C. jejuni*), puis une goutte de chaque puits est déposée à un emplacement spécifique sur gélose Oxford pour *Listeria innocua* (Biokar Diagnostics, France), sur milieu MSRV pour *Salmonella* Enteritidis (milieu Rappaport-Vassiliadis semi-solide modifié, Biokar Diagnostics, France) ainsi que sur gélose Karmali et gélose Butzler pour *Campylobacter jejuni* (Oxoid, France). Les boîtes ainsi

obtenues sont incubées 24 à 48 h à 37°C avant lecture. L'existence d'une colonie caractéristique de *L. innocua*, *S. Enteritidis* ou *C. jejuni* à un endroit de la gélose indique la présence, à la fin de la dilution décimale, d'au moins une bactérie dans le puits considéré (Figure 19). Il est ainsi possible, pour chaque dilution, de connaître le nombre de puits positifs. Le calcul de la concentration bactérienne dans le broyat est ensuite réalisé, soit grâce au programme MPN Calculator (MPN Calculator build 23, Myke Curiale), soit grâce à une macro VBA (Visual Basic for Application, Microsoft, France) spécialement écrite pour l'occasion (code source en annexe). La concentration bactérienne est alors exprimée en log UFC·cm⁻². Le seuil de détection est évalué à -0,20 log UFC·cm⁻², soit 0,63 UFC·cm⁻².

V.3. Réductions décimales et analyse statistique

A partir des concentrations bactériennes mesurées pour une condition expérimentale donnée (type de traitement, durée de conservation) et exprimées en log UFC·cm⁻², une concentration bactérienne moyenne est calculée. La réduction bactérienne (R_t) observée après traitement et à l'instant t est calculée à partir de la différence entre la concentration bactérienne moyenne mesurée sur les témoins non traités à l'instant t (N_{0t}) et la concentration bactérienne moyenne mesurée sur les peaux traitées à l'instant t (N_t) selon l'Eqn 4, les concentrations étant exprimées en logarithme décimaux :

$$R_t = N_{0t} - N_t \quad \text{Eqn 4}$$

Par exemple, si la concentration bactérienne moyenne à la surface de peaux ayant subi un traitement donné est de $N_{T0} = 4,00 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ immédiatement après traitement (à T0) et de $N_{T7} = 3,00 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ après 7 jours de conservation (T7) et que les concentrations bactériennes moyennes mesurées à la surface de peaux non traitées (témoins) sont de $N_{0T0} = 6,00$ et $N_{0T7} = 7,00 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ à T0 et T7 respectivement, la réduction décimale immédiatement après traitement sera de $R_{T0} = N_{0T0} - N_{T0} = 2,00 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$. De même, la réduction décimale après 7 jours de conservation sera de $R_{T7} = N_{0T7} - N_{T7} = 4,00 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$.

L'incertitude sur la réduction décimale après un traitement donné est estimée grâce à l'écart de répétabilité sur les concentrations bactériennes obtenu après ce traitement. Par exemple, si après un traitement de 1 minute avec de l'acide lactique à 10% la concentration bactérienne moyenne est de $3,00 \pm 0,87 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ et que la concentration bactérienne moyenne observée sur les témoins non traités est de $7,00 \pm 0,23 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$, la réduction bactérienne obtenue suite à ce traitement sera de $4,00 \pm 0,87 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ (et non pas $\pm 0,23$ ou $\pm 1,10$)

Les analyses statistiques sont réalisées avec Statgraphics Centurion XV (StatPoint inc.). La différenciation des résultats des traitements est réalisée selon la procédure de la plus petite différence significative de Fischer (LSD, Least Significant Difference) avec un seuil de confiance de 95%. Sauf mention contraire, toutes les incertitudes indiquées correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Lors de la comparaison de traitements réalisés dans des conditions différentes (protocole expérimental, dispositif de traitement), présentant des concentrations bactériennes initiales différentes, la différenciation est réalisée sur la base des réductions bactériennes. Dans ce cas, les témoins non traités présentent une réduction décimale nulle. Dans l'exemple précédent, la réduction décimale moyenne observée sur les témoins non traités sera ainsi de $0,00 \pm 0,23 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$.

VI. Détermination de la teneur résiduelle en acide lactique

La teneur résiduelle en acide lactique après les traitements de décontamination est mesurée par chromatographie liquide haute performance après extraction de l'acide lactique.

VI.1. Extraction de l'acide lactique

Des disques de peau de 44,6 mm de diamètre sont traités dans les mêmes conditions que pour les essais de décontamination. Ces disques sont ensuite broyés dans de l'azote liquide. Les acides organiques sont extraits par chauffage sous reflux dans une solution d'éthanol

acide (éthanol 20%, HCl 0,005 N, VWR International, France). Après centrifugation et filtration, les cations sont éliminés grâce à une résine échangeuse de cations (Amberlite IR120). Après une dernière filtration (filtre 0,2 μm), l'acide lactique est dosé par chromatographie ionique. Trois répétitions sont réalisées hormis pour les témoins non traités et pour le traitement à 10% durant 30 minutes (5 répétitions).

VI.2. Dosage par HPLC ionique

Le dosage de l'acide lactique est réalisé grâce à une chaîne de chromatographie liquide haute performance DIONEX, disposant d'une précolonne (Dionex Carbopac PA1 Guard) et d'une colonne ionique (Dionex Ion Pac AS11). L'élution est faite par un gradient d'eau et de soude de 0,5 à 35 mM de soude (VWR International, France) sur 25 minutes avec un débit de 2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. L'acide lactique est mesuré par un détecteur conductimétrique (Dionex ED40) précédé par un surpresseur (Dionex ASRS) permettant d'éliminer les ions Na^+ par électrolyse. Les solutions étalons sont préparées à partir d'acide lactique à 90% (VWR International, France). Les concentrations en acide lactique sont calculées à partir de la surface des pics.

VII. Effet des traitements sur les propriétés organoleptiques des produits

VII.1. Évaluation de l'effet des traitements thermiques sur la peau

L'effet des traitements thermiques sur la couleur, l'aspect général et la texture de la peau est évalué dans les cinq minutes suivant la phase de refroidissement lorsque la peau est revenue à température ambiante. Des essais préliminaires de mesure de la couleur réalisés avec un colorimètre Minolta CR300 (Konica-Minolta, France) et un dispositif d'analyse d'image montrent que la variabilité de la couleur entre les peaux d'animaux différents, ou entre différents endroits d'une même peau est supérieure à la variation de couleur

provoquée par les traitements thermiques les plus drastiques du domaine expérimental étudié. Une mesure quantitative ne semble donc pas réalisable. Par ailleurs, la variabilité des peaux rend difficile la quantification des modifications de l'aspect général et leur faible épaisseur complique singulièrement la mesure de leur texture.

L'effet des traitements est donc évaluée qualitativement, de manière subjective, et noté selon une échelle à 3 niveaux, soit pas de modification visible (+), modification visible (-), modification importante (--).

VII.2. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle est menée à l'aide d'un jury de 10 personnes. Le seuil de sensibilité de chaque juré est déterminé en faisant goûter dans l'ordre des solutions d'acide de concentration croissante soit 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,2% et 0,5% v/v. Le seuil de sensibilité pour tous les jurés est de 0,05% (6 jurés) ou 0,1% (4 jurés).

Des disques de peau de 44,6 mm de diamètre sont traités avec des solutions d'acide lactique à 2% ou 10% v/v durant 1 minute ou 10 minutes dans les mêmes conditions que lors des tests microbiologiques. Afin de s'approcher le plus possible d'un produit réel (viande entourée de peau), ces disques de peau sont ensuite placés sur des cylindres de filet de poulet de même diamètre et de 1 à 1,5 cm d'épaisseur. L'ensemble est ensuite grillé à 180°C durant 15 minutes. Les produits ainsi obtenus sont présentés selon un schéma triangulaire. Les jurés doivent déguster en même temps la peau et la viande et la température des produits au moment de la dégustation est de 60°C environ. Pour chaque traitement (couple concentration en acide/durée du traitement), les jurés goûtent un morceau traité et deux morceaux témoins (peau non traitée) et doivent identifier quel morceau est différent des autres. Dans le cas où la différence n'est pas perceptible, les jurés donnent une réponse au hasard.

La probabilité que le nombre de réponses exactes soit le même que si tous les jurés avaient répondu au hasard est calculé par une loi binomiale (10 jurés, probabilité de réponse exacte pour chaque juré : 1/3).

Résultats et discussion

Ce chapitre présente dans un premier temps l'effet des traitements thermiques appliqués aux peaux de poulet inoculées avec *Listeria innocua* en analysant tout d'abord les températures existant à la surface de la peau avant de s'intéresser aux réductions bactériennes obtenues. Les dispositifs de traitements utilisés à l'INRA et au CIRAD sont comparés afin de s'assurer que, malgré leur conception différente, ils conduisent à des résultats similaires.

L'effet de traitements acides sur des peaux inoculées par *Listeria innocua* ou par un mélange de *Listeria innocua*, *Salmonella* Enteritidis et *Campylobacter jejuni* est ensuite présenté et discuté. Une attention particulière est portée à l'évolution de la concentration bactérienne au cours du stockage réfrigéré.

L'intérêt de combiner des traitements thermiques et acides est analysé dans le cas d'une inoculation des peaux de poulet par *Listeria innocua*.

Chacun de ces sous-chapitres commence par évaluer les conditions subies par les bactéries en surface des échantillons en décrivant les effets d'inactivation immédiatement après traitement d'une part et à l'issue d'une période de stockage réfrigéré de 7 jours d'autre part. Les résultats obtenus sont ensuite interprétés en fonction de la physiologie des bactéries, de leurs mécanismes de réponse aux stress, et analysés au regard des résultats antérieurs de la littérature.

Finalement, l'effet de ces différents traitements sur les propriétés sensorielles et les teneurs résiduelles en acide lactique sont présentés.

I. Traitement thermique

I.1. Stratégie expérimentale

Les traitements thermiques sont réalisés soit dans un système ouvert avec un jet de vapeur (essais réalisés à l'INRA de Theix), soit dans un système clos de type « cloche à vapeur » (essais réalisés au CIRAD-Réunion). Deux niveaux de température voisins de 70°C et de 100°C sont considérés. Les températures de 70°C visent à moins dégrader la peau des carcasses de volailles. Elles devraient également permettre de mieux mettre en évidence les éventuels effets de synergie existant entre le traitement acide et le traitement thermique. Les températures proches de 100°C présentent quant à elles une efficacité plus grande à durée de traitement équivalente. L'étude privilégie les temps de traitement courts, de l'ordre de 10 secondes, qui restent compatible avec les cadences industrielles des chaînes d'abattage. Dans le cas des traitements à 70°C, la durée de traitement est portée à 15 secondes pour compenser la plus lente montée en température et obtenir une durée effective du traitement de l'ordre de 10 secondes. Quelques essais sont effectués pendant 1 minute à 70°C pour évaluer la décontamination maximale qu'il serait possible d'atteindre à ce niveau de température. Dans tous les cas, les essais sont réalisés avec des peaux fraîches issues de hauts de cuisses de poulets achetés en grande surface. Le Tableau 7 résume les principales conditions expérimentales.

I.2. Température de surface du produit

I.2.1 Dispositif de l'INRA de Theix

Des relevés de température de surface obtenus à partir d'une mesure infrarouge sur des échantillons soumis à des jets de vapeur sont présentés à titre d'illustration sur la Figure 20. La figure permet de distinguer nettement les trois phases thermiques soit (1) la condensation de la vapeur en surface du produit, (2) le maintien en température et (3) le refroidissement brutal lié à l'impact du jet d'air froid.

Dans le cas du traitement à 98°C, l'échantillon est localisé à 4 cm de la sortie du jet de vapeur qui est donc faiblement mélangé à l'air. Il suffit d'une seconde pour atteindre une température en surface de l'échantillon voisine de 98°C. Celle-ci reste ensuite constante, à $\pm 1^\circ\text{C}$ près, jusqu'à la fin du traitement. Il est alors possible de fixer avec précision la durée du traitement, qui est ici de 10 secondes. Pour obtenir une température inférieure en surface de l'échantillon, il faut éloigner l'échantillon de la sortie du jet de vapeur. La vapeur est alors fortement mélangée à l'air et l'écoulement dans le jet est nettement plus instationnaire. Il faut alors plusieurs secondes pour obtenir une température en surface de l'échantillon qui soit proche de la température de consigne (ici 70°C). Cette température de surface est également beaucoup moins stable au cours du traitement. Le laps de temps où la température est voisine de 70°C est plus difficile à définir avec précision par rapport au cas où l'échantillon est localisé immédiatement en sortie de jet de vapeur. La durée de ces essais conduits à 70°C est fixée à 15 secondes pour avoir une durée effective de traitement de l'ordre de 10 secondes à une température voisine de 70°C.

1.2.2 Pilote du CIRAD-Réunion

Les températures mesurées par un thermocouple posé à la surface de la peau, lors de trois répétitions différentes d'un traitement de 10 secondes à 100°C sont représentées sur la Figure 21. Sur la même figure sont indiquées les températures mesurées lors d'un essai à vide réalisé dans les mêmes conditions, mais sans la présence de l'échantillon de peaux de volailles (le thermocouple est alors à la même localisation mais sans qu'il n'y ait contact avec aucune surface). Les courbes obtenues étant quasiment identiques lors des essais en l'absence d'échantillon, une seule répétition a été représentée.

Lorsque l'échantillon à traiter est introduit dans l'enceinte, il est immédiatement exposé à de la vapeur saturée à 100°C comme le montrent les essais réalisés en l'absence d'échantillon. Les durées de montée et de descente en température sont très courtes, de l'ordre de la seconde. En revanche, lorsque le thermocouple est placé au contact de la peau, les températures mesurées sont beaucoup plus variables d'un essai à l'autre. Les températures moyennes calculées sur la durée du traitement varient entre 60 et 80°C. Les températures mesurées dépendent de la qualité thermique du contact entre le

thermocouple et la peau et surtout de la formation de gouttes de condensats qui peuvent se maintenir à ce niveau et qui limitent les échanges thermiques. Le seul moyen de s'affranchir de ces phénomènes serait d'utiliser un capteur de mesure à distance (comme le pyromètre IR utilisé à l'INRA-Theix). Mais l'introduction d'un tel capteur dans l'enceinte le soumettrait à des températures qu'il ne pourrait supporter, et il serait aussi soumis à de la condensation ce qui fausserait sa mesure. Des montages spécifiques très complexes auraient donc été nécessaires pour effectuer une telle mesure sans contact et ce travail ne pouvait être entrepris ici.

L'essai mené sans échantillon montre que l'atmosphère de vapeur est effectivement saturée dans l'enceinte avec une température d'ambiance de 100°C. Dans ce cas, les essais menés à Theix (cf. fig. 21 traitement à 98°C) et les résultats de la littérature montrent que la température en surface de l'échantillon devient rapidement voisine de 100°C, sauf si des condensats plus froids sont projetés ou maintenus sur cette surface, raison pour laquelle un soin particulier a été apporté lors de la conception du dispositif utilisé au CIRAD pour éviter la chute de gouttes de condensats sur l'échantillon. Malgré ces précautions, le simple fait d'introduire un thermocouple froid au contact de la surface de la peau conduit à générer artificiellement une poche de condensats qui se trouve piégée à ce niveau, ce qui explique ensuite les valeurs de températures mesurées par le capteur. La température mesurée par le thermocouple est donc dans ce cas biaisée par la présence du capteur lui-même. En l'absence de résultats complémentaires, il semble raisonnable d'affirmer que les températures existant réellement en surface de l'échantillon pendant les traitements dans le prototype du CIRAD (en l'absence du thermocouple, essais microbiologiques) sont voisines de celle de la vapeur.

I.3. Effets des traitements sur *Listeria innocua*

Le Tableau 8 présente les concentrations en *Listeria innocua* et les réductions décimales observées à des niveaux de températures proches de 70°C et de 100°C. Le nombre d'essais pour lequel la concentration bactérienne était inférieure au seuil de détection a été noté pour chaque condition expérimentale. Les essais de décontamination à 100°C ont été réalisés dans le système « en cloche de vapeur » du CIRAD et répétés cinq fois. Les essais de

décontamination à 98°C et 70°C ont été réalisés dans le système par jet de vapeur de l'INRA et répétés dix fois.

a. Températures de surface voisines de 100°C

La réduction bactérienne observée sur *Listeria innocua* immédiatement après un traitement à 100°C durant 10 secondes appliqué avec le prototype du CIRAD-Réunion n'est pas significativement différente de celle observée après un traitement à 98°C durant 10 secondes appliqué avec le dispositif de l'INRA de Theix ($4,66 \pm 0,27$ et $4,32 \pm 0,78$ log UFC·cm⁻² respectivement). Ces résultats confirment que la température atteinte par l'échantillon dans le cas du dispositif CIRAD est proche de 100°C. Ils montrent ainsi que ces expériences menées dans des installations différentes peuvent être comparées à conditions d'avoir une température de surface similaire (98°C et 100°C) et de travailler sur des échantillons de même nature (peaux fraîches de hauts de cuisses de poulet). Il sera donc possible par la suite de comparer les résultats obtenus sur *Listeria innocua* à l'INRA de Theix avec les résultats obtenus sur des flores pathogènes avec le pilote utilisé au CIRAD-Réunion, ce dernier ayant été développé dans cet objectif.

Dans le dispositif de l'INRA de Theix, la réduction immédiate de la population de *Listeria innocua* après un traitement de 10 secondes à 98°C est de 4,32 log UFC·cm⁻² et la concentration bactérienne est inférieure au seuil de détection dans 4 cas sur 10. Cette réduction décimale est plus élevée que celle décrite dans la littérature notamment par Kondjoyan et Portanguen (2008a) avec la même souche bactérienne et dans les mêmes conditions expérimentales (environ 2,5 log). Elle est également plus importante que celles obtenues par d'autres auteurs pour des conditions de température a priori similaires mais avec des bactéries différentes. Ainsi, McCann *et al.* (2006b) obtiennent des réductions décimales de 2,91 log UFC·cm⁻² sur *E. coli* O157:H7 et *Salmonella typhimurium* DT104 après avoir traité des échantillons de peau de poulet avec de la vapeur à 87°C durant 10 secondes. Whyte *et al.* (2003) observent quant à eux des réductions de 0,61 log UFC·g⁻¹ du nombre d'entérobactéries présentes sur des carcasses de poulet crues après un traitement à la vapeur de 12 secondes à 90°C. De même, James *et al.* (2000a) mesurent une réduction de

1,22 log du nombre d'*E. coli* O80 inoculées sur des échantillons de poitrine de poulet traitées à la vapeur durant 10 secondes (température de surface estimée à 90°C).

Kondjoyan et Portanguen (2008a) ont montré, qu'en vapeur surchauffée, la température en surface de la peau de poulet et l'efficacité du traitement peuvent être directement corrélées à l'épaisseur de la peau si le traitement est court (10s). Ils ont également observés que même après 30s de traitement l'inactivation la moins élevée correspondait à la peau la plus épaisse (1,9 mm) sans que cela ne se traduise par une différence de température de surface. Les épaisseurs de peau ont donc été mesurées systématiquement lors des essais menés à l'INRA de Theix à des températures de 98°C et de 70°C (Figure 22). L'épaisseur de peau moyenne mesurée lors de ces essais est de 0,8 mm avec des extrêmes compris entre 0,5 mm et 1,1 mm. Cette épaisseur est moins importante que celle mesurée pendant les expériences de Kondjoyan et Portanguen (2008a) où l'épaisseur moyenne était de 1,1 mm avec des valeurs extrêmes de 0,7 mm et de 1,9 mm. Lors des expériences menées ici, aucune corrélation n'apparaît à première vue entre l'efficacité du traitement et l'épaisseur de la peau en considérant l'ensemble des résultats (Figure 22). Toutefois si l'on ne considère que les traitements courts (10s à 98°C, triangles Figure 22) et les cas où la décontamination est la plus faible (i.e. en éliminant les points situés au voisinage du seuil de détection où la population est de l'ordre de 1,0 log), il apparaît une tendance vers une augmentation de la population résiduelle en fonction de l'épaisseur de la peau. Il semble donc qu'il existe deux catégories différentes, la première où les bactéries ne sont pas entièrement détruites au cours du traitement et où la charge bactérienne résiduelle est corrélée à l'épaisseur de la peau, et une deuxième catégorie où la charge bactérienne chute sous le seuil de détection à l'issue du traitement. Le nombre d'expériences reste cependant insuffisant pour permettre des conclusions précises au vu de la variabilité expérimentale. Les effets cumulés des différences d'épaisseur et teneur en matière grasse des peaux de poulets utilisés lors des expériences pourraient donc expliquer la plus grande efficacité de décontamination observée au cours de ce travail dans le cas de traitements courts (10s à 98°C ou 100°C).

Après 7 jours de conservation à 4°C, la croissance bactérienne est plus forte suite à un traitement de 10 secondes à 98°C que sur des témoins non traités (1,20 log au lieu de 0,46

log UFC·cm⁻²). Le nombre de répétitions présentant des concentrations bactériennes inférieures au seuil de détection diminue au cours du stockage, de 4/10 à T0 à 2/10 à T7 (Tableau 8). Une telle croissance bactérienne durant le stockage après un traitement thermique a déjà été observée dans la littérature. Shin *et al* (2006) montrent que si un traitement thermique à 75°C réduit la charge en *Listeria monocytogenes* de plus de 3,5 log dans une purée d'asperge, les bactéries survivantes se multiplient rapidement par la suite et la charge bactérienne retrouve son niveau initial après 3 jours de conservation. Avec un substrat plus proche de celui utilisé dans ce travail (poitrines de poulet avec peau), James *et al.* (2000a) observent que la flore totale aérobie mésophile, réduite de 1,7 log après un traitement de 10 secondes avec de la vapeur à 98°C, retrouve son niveau initial après 3 jours de stockage. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer cette croissance bactérienne rapide après traitement thermique. Abee et Wouters (1999) ont montré que chez la plupart des espèces microbiennes, un chauffage court à des températures supérieures à l'optimum de croissance peut induire la synthèse de protéines spécifiques appelées protéines de choc thermique (HSP). Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de réparation des dégâts causés par les chocs thermiques (Pagán *et al.* 1997). Gahan *et al* (2001) expliquent que la transcription de deux gènes codant pour des protéines de choc thermique (GroES et GroEL) chez *Listeria monocytogenes* atteint un maximum dans les 15 minutes après un choc thermique à 45°C (en milieu liquide) et que ces HSP peuvent être détectées 30 minutes après le choc thermique. Mais dans le cadre de nos expériences lors des dénombrements à T0, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectif (PALCAM) dans les 5 minutes qui suivent le traitement thermique. Les bactéries lésées par le traitement n'ont donc pas le temps de récupérer avant d'être soumises au stress du milieu sélectif. Miller *et al* (2006) ont observé que la récupération des bactéries thermiquement stressées est réduite sur un milieu sélectif (milieu PALCAM et TSAYE + NaCl). En effet, les valeurs de D₆₅ (durée nécessaire pour qu'un traitement thermique à 65°C réduise de 1 log la concentration bactérienne) sont trois fois plus importantes quand les dénombrements sont réalisés sur les milieux sélectifs mentionnés. Dans notre cas, après 7 jours de stockage au froid, la synthèse des HSP et les mécanismes de réparation des bactéries ont eu le temps d'être exprimés, permettant aux cellules lésées de récupérer et de résister plus facilement au stress du milieu sélectif. La concentration en *Listeria innocua* survivantes à la surface des peaux traitées est donc peut-être sous-estimée à T0. Ce phénomène aurait donc amplifié la

croissance bactérienne apparente sur les peaux traitées. De plus, la diminution de la flore de compétition encourage probablement la croissance des bactéries survivantes. Par ailleurs, la destruction des cellules de la peau par le traitement thermique peut faciliter l'accès des bactéries survivantes aux nutriments. A contrario, l'effet Jameson, i.e. la suppression de la croissance de toutes les populations bactériennes par une forte charge bactérienne totale (Gimenez et Dalgaard, 2004; Ross *et al.* 2000) peut expliquer que dans le cas de témoins non traités aucune croissance bactérienne ne soit observée au cours du stockage.

b. Températures de surface voisines de 70°C

La variabilité des concentrations en *Listeria innocua* mesurées à la surface des peaux de poulet après des traitements de 10 secondes effectives à 70°C est du même ordre de grandeur que pour des traitements de 10 secondes à 98°C, et ce malgré des variations plus importantes de la température de surface mesurées. Cela tendrait à montrer que les écarts de population microbienne observés entre les différentes répétitions d'un même traitement ne proviennent pas de fluctuations de la température bien que dans le cas présent, ces variations puissent être compensées par le fait que le dénombrement est plus précis dans les expériences à 70°C par rapport à celles effectuées à 98°C. En effet, le nombre de répétitions présentant des concentrations bactériennes réellement dénombrables (supérieures au seuil de détection) est plus important pour le traitement le plus doux.

Les réductions bactériennes mesurées à l'issue de 10 secondes effectives de traitement à 70°C ($1,49 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) sont nettement plus faibles que celles obtenues à 98°C pour la même durée de traitement. Elles sont proches des réductions de 2,11 log observés par Logue *et al.* (2004) dans des conditions similaires (10 secondes à 75°C) mais avec un substrat et des bactéries différentes (muscle de bœuf inoculé avec *E. coli* O157:H7). Pratiquement aucune croissance bactérienne n'est ensuite observée au cours du stockage de la peau de poulet à 4°C, contrairement à ce qui est observé pour le traitement effectué à 98°C. Comme à 70°C les concentrations bactériennes mesurées juste après traitement sont élevées car proches de celles observées sur les témoins non traités (5,16 et 6,65 $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ respectivement). Des phénomènes de compétition de type effet Jameson, pourraient

expliquer l'absence de croissance observée dans ces conditions après 7 jours de stockage à 4°C.

Après un traitement thermique à 70°C durant 1 minute, la réduction immédiate du nombre de *Listeria innocua* présent sur la peau est de 5,44 log UFC·cm⁻² et le nombre de *Listeria innocua* est inférieur au seuil de détection dans 8 cas sur 10 (Tableau 8). La population bactérienne résiduelle est de l'ordre de 1,6 log ce qui correspond à celle obtenue pour le même temps de traitement à 98°C et en vapeur surchauffée par Kondjoyan et Portanguen en 2007 (Figure 9 et Figure 10). La température semble donc augmenter l'efficacité de la décontamination dans les 30-40 premières secondes de traitement mais ne semble pas avoir beaucoup d'effet dans la phase ultérieure « de traînée » où la population tend vers un niveau résiduel. Dans cette phase de traînée, les bactéries survivantes font a priori partie d'une population plus résistante au traitement thermique et sont en plus faible quantité à la surface de la peau de poulet (McCann *et al.* 2006b). Les réductions bactériennes observées ici sont supérieures à celles relevés par Klose *et al.* (1971) pour des températures similaires mais pour des durées plus importantes (traitement de carcasses entières à 71°C – 75°C durant 4 minutes, réductions décimales de 3 log pour *Salmonella typhimurium* et 2 à 2,5 log pour la FTAM). Dans la mesure où les réductions décimales présentées par Klose *et al.* (1971) sont obtenues avec des protocoles de traitement thermique et de dénombrement bactérien très différents et avec un faible nombre de répétitions, il est difficile de discuter plus avant l'écart avec les résultats obtenus dans le cadre de ce travail. Les dénombrements réalisés après 7 jours de conservation à 4°C montrent une légère augmentation de la population bactérienne moyenne sur les échantillons traités à 70°C pendant 1 minute. Bien que cette augmentation ne soit pas statistiquement significative (0,6 log UFC·cm⁻²), le nombre de répétitions présentant des concentrations bactériennes inférieures au seuil de détection est divisé par deux au cours du stockage (4 cas sur 10 après 7 jours de stockage contre 8 cas sur 10 immédiatement après traitement). Ceci révélerait une légère croissance de la population bactérienne durant le stockage, qui pourrait sans doute être mise en évidence si le seuil de détection était plus faible.

I.4. Effets des traitements sur *Salmonella Enteritidis*

Après la validation du dispositif de traitement thermique développé au CIRAD, celui-ci a été utilisé pour appliquer un traitement de 10 secondes à 100 °C à des disques de peau de poulet inoculés avec *Salmonella Enteritidis*. Les concentrations bactériennes et les réductions décimales obtenues sont présentées dans le Tableau 9. Compte tenu de la variabilité des résultats, les niveaux de réduction ne sont pas significativement différents de ceux observés pour *Listeria innocua* dans des conditions de traitement similaires. Immédiatement après traitement, la réduction bactérienne observée est proche des 2,91 log observées par McCann *et al.* (2006b) sur de la peau de poulet inoculée avec *Salmonella* Typhimurium DT104 pour un traitement de 10 secondes avec de la vapeur à 100°C, la température de surface étant estimée à 87°C. Les différences de réduction décimale ne sont pas étonnantes dans la mesure où les souches bactériennes et les températures en surface sont différentes. Au cours du stockage, la charge bactérienne n'augmente pas de manière significative compte tenu de la variabilité des résultats. Ces résultats ne peuvent être confrontés à la littérature car, à notre connaissance, aucune étude n'aurait été menée sur le suivi des concentrations en *Salmonella* spp. en cours de stockage de produits traités thermiquement.

II. Traitements acides

II.1. Décontamination acide de *Listeria innocua*

II.1.1 Réduction immédiate de la population après traitement

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements acides sur la décontamination de peaux de volailles inoculées par *Listeria innocua*, un plan factoriel 2^2 (deux facteurs et deux niveaux, concentration en acide lactique de 2% v/v et 10% v/v et durée du traitement de 1 minute et 10 minutes) a été réalisé. Un tel plan autorise la quantification des effets de la concentration en acide lactique et de la durée de traitement et de leur éventuel effet d'interaction. Les

essais ont été réalisés au CIRAD-Réunion sur des peaux de poulets congelées, inoculées avec *Listeria innocua*, selon la méthode mise au point au CIRAD (temps de contact de 2h et rinçage des peaux). Pour chaque point du plan, les mesures sont répétées 3 fois. Un témoin ensemencé, rincé, mais non traité est utilisé et répété 4 fois. Les concentrations bactériennes et les réductions décimales obtenues pour les différents traitements sont résumées dans le Tableau 10.

Hors du cadre du plan d'expérience, des essais de décontamination acide ont été menés sur des peaux de poulet fraîches inoculées avec *Listeria innocua* selon la méthode employée à l'INRA de Theix (une minute de contact avec la solution d'inoculation, pas de rinçage). Les essais sont répétés 10 fois pour chaque condition expérimentale. Les résultats sont eux aussi présentés dans le Tableau 10.

L'analyse statistique des résultats a été réalisée de deux manières différentes. Dans un premier temps les concentrations bactériennes ont été comparées entre elles selon la procédure de la plus petite différence significative de Fischer. Dans un deuxième temps, les réductions décimales ont été comparées. La variabilité des résultats obtenus au CIRAD-Réunion et à l'INRA de Theix est similaire, Les concentrations bactériennes des témoins non traités ne sont pas significativement différentes (Tableau 10) tant pour les essais réalisés au CIRAD-Réunion sur des peaux de poitrine congelées que pour les essais réalisés à l'INRA de Theix sur des peaux fraîches de hauts de cuisses, malgré les différences de substrat (peaux congelées ou fraîches) et de méthodologie (inoculation longue ou courte, avec ou sans rinçage, technique de dénombrement). De même, les concentrations bactériennes mesurées au CIRAD-Réunion et à l'INRA de Theix après les traitements à l'acide lactique à 10% durant 1 et 30 minutes ne sont pas statistiquement différentes. La congélation des peaux et la zone de prélèvement de celles-ci ne semblent donc pas avoir une influence significative sur le niveau de fixation des bactéries sur la peau et l'efficacité d'un traitement acide, du moins en ce qui concerne les concentrations en bactéries survivantes. Pour ce qui est des réductions bactériennes, si elles ne sont pas significativement différentes pour un traitement à l'acide lactique à 10% durant 30 minutes, un traitement plus court (10% 1 minute) s'avère en revanche significativement plus efficace sur des peaux fraîches de hauts de cuisses que sur des peaux de poitrines congelées ($1,47 \pm 0,23 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ et $0,60 \pm 0,32 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$

respectivement). La seule étude à notre connaissance comparant l'efficacité de traitements chimiques sur différentes zones de la peau de carcasses de poulet concerne des traitements au TSP (Capita *et al.* 2002c) et conclut à une efficacité plus grande des traitements sur des peaux de poitrines que sur des peaux de hauts de cuisse, à l'opposé de ce qui est observé ici. La congélation et la décongélation de la peau peut augmenter le nombre d'irrégularités de la surface dans lesquelles les bactéries fixées peuvent être protégées du contact direct avec la solution d'acide. Il est envisageable que pour des traitements courts, et un dénombrement des bactéries survivantes réalisé immédiatement après traitement, l'acide lactique ne puisse pas avoir le temps de diffuser suffisamment pour atteindre toutes les zones où les bactéries sont localisées. Il est également possible que la congélation et la décongélation, en lésant les cellules de la peau, libèrent en surface une certaine quantité de composés organiques présentant un effet tampon diminuant l'efficacité du traitement à l'acide lactique. Dans le cas de traitements plus longs (30 minutes), ces composés organiques auraient le temps de se diluer dans tout le volume de la solution d'acide lactique (25 ml).

D'une manière générale, l'efficacité des traitements augmente avec la durée du traitement et la concentration en acide lactique. Immédiatement après traitement, les réductions bactériennes sont significatives pour tous les traitements sauf les traitements les plus courts réalisés sur de la peau congelée (2% et 10% 1min). Pour les traitements de 30 minutes, les réductions atteignent $1,19 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ avec des solutions à 2% et de 2,45 à $2,66 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ avec des solutions à 10%. En ce qui concerne le traitement de peaux fraîches inoculées avec *Listeria innocua* par une solution d'acide lactique à 5% durant 1 minute, l'efficacité immédiate semble deux fois plus faible que dans le cas d'un traitement de même durée avec une solution d'acide lactique à 10% (réduction décimale de $0,71 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ au lieu de $1,47 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$). Cependant, cette différence n'est pas significative étant donné l'importance de la variabilité des résultats. Les niveaux de décontamination sont semblables à ceux observés par Gonzalez-Fando et Dominguez (2006) qui, pour des traitements à 1,6% et 4%, ont obtenu des réductions similaires ($0,60 \pm 0,21$ et $1,05 \pm 0,14 \log$ respectivement), mais pour des durées de traitement plus longues (5 minutes). Comme les résultats obtenus avec une concentration en acide lactique de 10% sont tout à fait originaux aucune comparaison avec la littérature n'a été possible.

Les résultats obtenus dans le cadre du plan d'expérience réalisé au CIRAD-Réunion ont permis de quantifier l'effet des différents facteurs (durée du traitement et concentration en acide) et les éventuels effets d'interaction. Le seuil de signification de chaque facteur est déterminé par une ANOVA multifacteur. Avant les tests d'ANOVA, un test de Levene est réalisé pour vérifier l'homogénéité des variances. L'équation du modèle de réduction bactérienne utilisé est présentée ci-dessous (Eqn 5). Les effets des différents facteurs et leur seuil de signification sont présentés dans le Tableau 11.

$$R_t = a + b \cdot C_n + c \cdot D_n + d \cdot C_n \cdot D_n \quad \text{Eqn 5}$$

Dans cette équation, R_t représente la réduction décimale à l'instant t (ici T_0 , immédiatement après traitement), C_n la concentration en acide lactique normalisée (-1 pour un traitement à 2%, +1 pour un traitement à 10%) et D_n la durée de traitement normalisée (-1 pour une durée de traitement de 1 minute, +1 pour une durée de 30 minutes). Le coefficient a du modèle correspond à la constante, b et c correspondent respectivement aux effets de la concentration en acide C_n et de la durée du traitement D_n et le coefficient d correspond à l'effet d'interaction entre ces facteurs. La normalisation des variables permet de comparer les effets des facteurs entre eux et le coefficient de régression du modèle décrit le niveau d'adéquation du modèle avec les données expérimentales.

Le coefficient de régression du modèle linéaire est de 0,90 (Tableau 11). Les données expérimentales sont donc bien représentées par le modèle choisi. La concentration en acide lactique, la durée du traitement et l'interaction entre ces deux facteurs ont des effets significatifs sur la réduction décimale. Dans la plage de valeurs étudiées, la durée de traitement présente l'effet le plus important et son accroissement augmente très significativement la réduction bactérienne ($p < 0,001$). La concentration en acide lactique quant à elle, présente un effet presque deux fois inférieur à la durée du traitement, mais cet

effet reste significatif ($p < 0,01$). L'effet d'interaction positif met en évidence une synergie entre ces deux facteurs ($p < 0,05$).

II.1.2 Évolution cinétique des populations de *Listeria innocua* inoculées seules ou en mélange au cours du stockage

La littérature laissant entrevoir un effet de rémanence des traitements acides (Hwang et Beuchat, 1995; Okolocha et Ellerbroek, 2005; Ozdemir *et al.* 2006), la mesure de la concentration en *Listeria innocua* survivantes a été réalisée immédiatement après traitement (T0) mais également après 7 jours de conservation à 4°C (T7) dans le cadre du plan d'expérience. Des traitements à l'acide lactique à 2% et 10% durant 1 et 30 minutes ont ainsi été appliqués sur des peaux congelées de poitrine de poulet provenant toutes du même lot. Ces peaux ont ensuite été conservées 7 jours à 4°C dans des boîtes de Petri entourées de parafilm afin d'éviter toute dessiccation excessive. Les essais ont été répétés 3 fois pour chaque condition expérimentale, et 4 fois pour le témoin inoculé mais non traité. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

A partir des résultats ainsi obtenus, un point de fonctionnement intermédiaire a été choisi (traitement par l'acide lactique à 5% durant 1 minute) et une cinétique de décontamination plus fine a été réalisée, en dénombrant les bactéries survivantes immédiatement après traitement et après 1, 4 et 7 jours de conservation à 4°C (T0, T1, T4 et T7 respectivement). Dans le cadre de cette cinétique fine et afin de s'approcher autant que possible des conditions réelles de contamination des volailles, des peaux fraîches des hauts de cuisses ont été inoculées avec un mélange de *Listeria innocua*, et *Salmonella* Enteritidis. De même, l'inoculation a été conduite de manière à obtenir une concentration initiale à la surface de la peau beaucoup plus faible ($4,18 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ pour *Listeria innocua* au lieu de 6 log dans les essais précédents) moins éloignée des niveaux de contamination auxquels on peut s'attendre en conditions réelles. Le dénombrement des bactéries survivantes a été réalisé grâce à la technique du MPN, ce qui permet d'abaisser le seuil de détection et de compenser

cette plus faible contamination initiale. Les essais ont été répétés cinq fois pour chaque condition expérimentale. Les résultats de cette cinétique fine sont présentés en Figure 23.

Après 7 jours de conservation à 4°C, la variabilité des mesures est plus grande qu'immédiatement après traitement (entre $\pm 0,33$ et $\pm 1,70$ log UFC·cm⁻² à T7 contre $\pm 0,14$ à $\pm 0,63$ log UFC·cm⁻² à T0, cf. Tableau 12 et Tableau 10). Cette augmentation de la variabilité est particulièrement importante dans le cas des essais réalisés au CIRAD-Réunion, où seulement 3 répétitions ont été réalisées pour chaque condition expérimentale (Tableau 12). D'une part, l'étape de stockage entraîne une cause de variabilité supplémentaire, même si toutes les précautions ont été prises pour que les conditions de stockage (température, humidité) soient identiques pour tous les échantillons. D'autre part, la croissance ou la destruction bactérienne au cours du stockage subirait les influences combinées de facteurs tels que la concentration bactérienne à la surface de la peau à la fin du traitement, la structure de la peau ou la teneur résiduelle en acide lactique. Les interactions complexes entre ces facteurs entraîneraient des variations du nombre de bactéries sur la peau au moment de l'analyse d'autant plus grande que la durée de conservation est longue.

Les concentrations bactériennes mesurées à la surface des peaux congelées de poitrine (essais réalisés au CIRAD-Réunion) et des peaux fraîches de hauts de cuisses (essais réalisés à l'INRA de Theix) ne sont pas significativement différentes à T7, que ce soit pour les témoins non traités ou pour les peaux traitées avec des solutions d'acide lactique à 10%. Les réductions décimales observées à T7 pour des traitements à 10% durant 30 minutes ne sont pas significativement différentes. En revanche, pour des traitements à 10% durant 1 minute, la réduction décimale est significativement plus élevée sur des peaux de hauts de cuisses fraîches que sur des peaux de poitrine congelées ($5,25 \pm 0,83$ et $3,43 \pm 1,70$ log UFC·cm⁻² respectivement). Cet effet a déjà été relevé immédiatement après traitement (cf paragraphe II.1.1 ci-dessus) et les causes en sont probablement les mêmes.

Après stockage, seuls les traitements à l'acide lactique à 5% et 10% permettent d'obtenir des réductions bactériennes significatives. Pour ces conditions, l'effet du traitement s'est

poursuivi au cours du stockage. En effet, la concentration bactérienne est plus faible après 7 jours de stockage que juste après traitement (4,60 log UFC·cm⁻² à T7 et 5,93 log UFC·cm⁻² à T0 pour un traitement à 5% durant 1 minute). L'incertitude des mesures ne permet pas de savoir si le même phénomène se produit avec les traitements à l'acide lactique à 2%. Par ailleurs, pour le traitement le plus drastique (10% 30min), deux des trois répétitions ont donné des résultats inférieurs au seuil de détection. Les concentrations bactériennes ont donc été arbitrairement fixées au seuil de détection. Il n'est donc pas possible, d'après ces données, de savoir si un traitement de 30 minutes à 10% est plus efficace qu'un traitement de 1 minute. Gonzalez-Fando et Dominguez (2006) observent des différences plus importantes entre les échantillons traités et les témoins après 7 jours de conservation comparées au temps T0. Toutefois ces différences restent limitées et sont observées sur une population bactérienne en forte croissance. Dans les essais de Gonzalez-Fando et Dominguez (2006), la population de *Listeria innocua* augmente de 2,9 log en 7 jours sur les témoins et de 2,2 log sur les échantillons traités avec une solution d'acide à 5%. L'effet des acides se traduit donc uniquement par un léger ralentissement de la croissance pendant le stockage. Dans notre étude, au contraire, aucune croissance bactérienne n'est observée, même sur les témoins non traités et un effet bactéricide très fort est observé pour les traitements avec les solutions d'acide à 10%. Les concentrations de *Listeria innocua* après 7 jours de stockage sont donc complètement différentes. La concentration mesurée par Gonzalez-Fando et Dominguez (2006) est de 5,95 log pour un traitement avec un acide à 5% tandis qu'elle est inférieure à 1,67 log dans le cas de notre traitement le plus drastique. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le fait que la population de *Listeria monocytogenes* continue à croître dans les essais de Gonzalez-Fando et Dominguez (2006) tandis qu'aucune croissance n'est observée dans notre étude. Les niveaux d'inoculation en *Listeria* sont beaucoup plus faibles chez Gonzalez-Fando et Dominguez (4,27 log) que dans nos expériences (6,26 log). Ceci peut s'expliquer en partie par une concentration plus faible de la solution d'inoculation (7,00 log UFC·ml⁻¹) chez ces auteurs et un protocole d'inoculation différent (immersion de 5 minute dans la solution, séchage de 15 minutes). Le fait que les bactéries soient plus nombreuses entraîne aussi une compétition plus intense par rapport au substrat, et donc des comportements de croissance différents. En effet, l'effet Jameson, largement décrit dans la littérature (Gimenez et Dalgaard, 2004; Ross *et al.* 2000), montre qu'une concentration bactérienne trop élevée inhibe la croissance de toutes les populations

présentes. Ainsi, sur du saumon fumé sous vide, la croissance d'une population de *Listeria monocytogenes* est interrompue lorsque la flore totale a atteint sa densité de population maximale (Gimenez et Dalgaard, 2004), les concentrations finales en *Listeria monocytogenes* et en flore totale étant respectivement de 4 et 8 log UFC·cm⁻² dans ce cas précis.

En s'intéressant de plus près à la cinétique de décontamination (Figure 23), on constate que l'effet d'un traitement à 5% durant 1 minute est particulièrement important entre T0 et T1. Après 1 jour de stockage, la réduction bactérienne s'accroît progressivement. Ce phénomène semble plus lié à une croissance de la concentration en *Listeria innocua* à la surface des témoins non traités au cours du stockage, bien que cette croissance ne soit pas significative au regard de la variabilité des dénombrements. Les réductions décimales à T0 et à T7 ($0,41 \pm 0,42$ et $2,00 \pm 1,05$ log UFC·cm⁻² respectivement, Figure 23) sont similaires à celles observées dans le cadre des essais réalisés à l'INRA de Theix ($0,71 \pm 0,14$ et $2,54 \pm 0,72$ log UFC·cm⁻² à T0 et T7, Tableau 10 et Tableau 12). Dans le cadre de cette étude cinétique, l'effet du traitement n'est pas significatif à T0, alors qu'il est significatif dans les essais réalisés à l'INRA de Theix (Tableau 10), et la variabilité des dénombrements est plus grande. Cette plus grande variabilité, masquant l'effet du traitement à T0, n'est pas étonnante car si les substrats sont similaires (peaux fraîches de hauts de cuisses de poulet), les niveaux d'inoculation sont très différents (de l'ordre de 4,18 log UFC·cm⁻² et 6,65 log UFC·cm⁻² respectivement) et l'inoculation a été réalisée avec un mélange de bactéries et non pas avec des *Listeria innocua* en culture pure. De plus, cinq répétitions seulement ont été réalisées au lieu de 10 dans le cas des essais à l'INRA de Theix. La réponse de *Listeria innocua* aux traitements acides reste donc la même lorsqu'elle est inoculée seule à forte concentration, ou en mélange avec *Salmonella* Enteritidis et à des concentrations plus faibles.

II.2. Décontamination acide de *Salmonella* inoculées en mélange

Concernant la cinétique de décontamination (Figure 24), on constate que l'effet d'un traitement à 5% durant 1 minute est particulièrement important entre T1 et T4. Jusqu'à 1 jour de conservation, la concentration bactérienne des peaux traitées n'est pas significativement différente de celle des peaux non traitées. Après 4 jours de stockage, en revanche, les concentrations en *Salmonella Enteritidis* diminuent de manière significative sur les peaux traitées et la réduction bactérienne obtenue atteint $2,78 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ à T4 et $2,38 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ après 7 jours de conservation. Entre 4 et 7 jours, ces concentrations augmentent à la même vitesse sur les témoins non traités et sur les peaux traitées. Sur *Listeria innocua* (Figure 23), l'effet du traitement était significatif dès 1 jour de stockage, puis la concentration bactérienne se stabilisait jusqu'à la fin de la durée de conservation. La différence de comportement de ces deux espèces bactériennes peut être mise sur le compte de leurs différentes vitesses de croissance et durées de phase de latence. En milieu liquide à 37°C, une culture pure de *Salmonella Enteritidis* CIP 82.97 atteint la phase stationnaire au bout de 48h, contre moins de 24h pour *Listeria innocua* CLIP 20-595 (Figure 12 et Figure 13). S'il est hasardeux de transposer de tels résultats au cas de bactéries fixées sur des surfaces complexes comme la peau de poulet, en présence d'autres souches bactériennes et d'une flore indigène nombreuse et variée il est raisonnable de penser que les différences de vitesse de croissance et de phase de latence pourraient être conservées et même amplifiées par la faible température de stockage (4°C) car *Listeria innocua* est psychrotrophe contrairement à *Salmonella Enteritidis*. Dans le cadre d'une compétition entre la croissance bactérienne et l'inactivation causée par les teneurs résiduelles en acide lactique, avant 4 jours, l'inactivation des bactéries est plus importante que leur croissance, les *Salmonella Enteritidis* se trouvant encore en phase de latence. Après 4 jours, cette phase de latence étant passée, la concentration bactérienne augmenterait de manière exponentielle, et la croissance bactérienne deviendrait supérieure à l'inactivation. Chez *Listeria innocua* dont la phase de latence est probablement plus courte et la vitesse de croissance supérieure, la croissance bactérienne deviendrait supérieure ou égale à l'inactivation dès T1, et la concentration bactérienne reste constante jusqu'à la fin de la période de conservation.

Quoiqu'il en soit, après 7 jours de conservation, les réductions bactériennes observées sont quasiment identiques chez *Listeria innocua* ($2,00 \pm 1,05 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) et *Salmonella* Enteritidis ($2,38 \pm 1,02 \log \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Les résultats trouvés dans la littérature sont peu nombreux et très contradictoires sur ce sujet, du moins pour les traitements à l'acide lactique (l'utilisation de TSP a été beaucoup plus étudiée). De plus, l'effet des traitements de décontamination est généralement évalué en termes de prévalence (proportion de carcasses contaminées), la charge bactérienne n'étant pas mesurée. Quelques études portant sur la charge bactérienne ont cependant été réalisées. Ainsi, pour un traitement à l'acide lactique à 2% durant 5 minutes de muscle de bœuf inoculé avec *Salmonella* Typhimurium, Ozdemir *et al.* (2006) observent une réduction de 0,7 log immédiatement après traitement et de 1,14 log après 5 jours de conservation. Sur des cuisses de poulet inoculées avec un mélange de cinq souches de *Salmonella*, dont *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium, les réductions décimales sont de 1,57 log immédiatement après traitement et de plus de 4,29 log après 5 jours de conservation, pour un traitement de 30 minutes avec mélange d'acide lactique à 0,5% et de benzoate de sodium à 0,05% (Hwang et Beuchat, 1995).

III. Traitements combinés

III.1. Effet de traitements combinés sur *Listeria innocua*

Le Tableau 13 résume les concentrations bactériennes et les réductions décimales observées après traitement de peaux de poulet fraîches inoculées avec *Listeria innocua*, classés par efficacité croissante du traitement. Ces peaux ont tout d'abord subi un traitement thermique réalisé sous un jet de vapeur puis un traitement acide. Les essais ont été répétés 10 fois pour chaque condition expérimentale. Le nombre de répétitions pour lesquelles la concentration bactérienne était inférieure au seuil de détection a été noté.

Dans le cas des traitements combinés sur *Listeria innocua* et pour des traitements de 10 secondes à 98°C ou de 1 minute à 70°C suivis de traitements avec des solutions d'acide lactique à 10% durant 30 minutes, la réduction décimale immédiatement après le traitement combiné n'est pas significativement différente de celle observée pour un traitement thermique seul (Tableau 8 et Tableau 13). Koutsoumanis *et al.* (2004) ont montré que l'exposition à un choc thermique (45°C et 50°C en milieu liquide) n'entraîne aucune tolérance ultérieure aux traitements acides chez *Listeria monocytogenes*. L'efficacité du traitement thermique étant bien supérieure à celle du traitement acide, la réduction bactérienne observée dans le traitement combiné provient essentiellement de la partie « thermique » de ce traitement. Au vu de ce résultat, la combinaison d'un traitement thermique à 98°C durant 10 secondes ou à 70°C durant 1 minute et d'un traitement acide plus court avec une solution à 10% durant 1 minute n'a pas été étudiée à T0.

Après 7 jours de conservation, les réductions décimales moyennes observées après un traitement à 98°C durant 10 secondes ou à 70°C durant 1 minute suivi d'un traitement acide à 10% durant 1 et 30 minutes ne sont pas significativement différentes de celles observées après des traitements acides seuls (Tableau 10 et Tableau 13). Cependant, elles sont significativement supérieures à la réduction décimale observée après un même traitement thermique appliqué seul. On observe donc un effet de rémanence important au cours du stockage et, après 7 jours de stockage, l'effet du traitement combiné provient essentiellement de la partie « acide » du traitement, alors qu'à T0 elle provenait uniquement de la partie « thermique » de ce traitement. Cet effet de rémanence, qui se traduit par la poursuite de la décontamination après traitement, pourrait être amplifié par la faible température de stockage. En effet, Koutsoumanis *et al.* (2004) ont démontré que la résistance aux chocs acides dépend de la température, et qu'en milieu liquide, *Listeria innocua* était moins résistante à des traitements acides appliqués à 4°C qu'à des traitements appliqués à 30°C. Le nombre non négligeable de répétitions pour lesquelles la concentration en *Listeria innocua* était inférieure au seuil de détection n'a pas permis d'identifier d'éventuels effets de synergie entre le traitement thermique et le traitement acide. Cependant, pour des traitements thermiques drastiques (98°C 10 secondes et 70°C 1 minute) combinés à des traitements acides à 10% durant 1 ou 30 minutes, la combinaison

des traitements a permis d'associer l'efficacité du traitement thermique à T0 et l'effet de rémanence du traitement à T7. Ainsi, les réductions bactériennes ont toujours été supérieures ou égales à celles de chaque traitement appliqué séparément, que ce soit immédiatement après traitement ou après 7 jours de conservation.

Afin de mettre en évidence d'éventuelles synergies entre les traitements, des traitements thermiques et acides qui, utilisés séparément, sont moins efficaces que les traitements étudiés précédemment, ont été appliqués. Le traitement combiné ainsi choisi se compose d'un traitement par la vapeur à une température de 70°C durant 15 secondes, suivi d'un traitement par l'acide lactique à 5% durant 1 minute. Immédiatement après traitement, les réductions décimales obtenues ne sont pas significativement différentes des réductions décimales obtenues avec le traitement thermique ou le traitement acide appliqué seul. A T0, il n'y a donc pas d'effet de synergie, ni même d'effet cumulatif entre les deux types de traitement. Par contre, après 7 jours de conservation à 4°C, la réduction décimale observée ($4,30 \log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$) est deux fois supérieure aux réductions décimales observées dans le cas des traitements thermiques et acides appliqués séparément (1,72 et 2,54 $\log \text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2}$ respectivement). Nous observons dans ce cas une réduction légèrement supérieure à l'addition des deux effets thermique et acide qui peut donc, aux incertitudes expérimentales près, être qualifiée de synergie.

Ce type de traitement est particulièrement prometteur d'un point de vue industriel, l'application d'une température de 70°C pendant 15s étant certainement moins agressive, par rapport à la texture de la peau que des traitements effectués à plus fortes températures.

III.2.Effet d'un traitement combiné sur *Salmonella* Enteritidis

Le prototype thermique construit au cours de cette thèse au CIRAD pour traiter des micro-organismes pathogènes permet difficilement d'obtenir des températures contrôlées de

l'ordre de 70°C en surface de peaux de poulets. Un traitement combiné correspondant pour la partie acide au traitement synergique précédent (concentration 5%, temps 1min.) mais avec une température de surface plus élevée (100°C) a été testée sur *Salmonella* Enteritidis pour en observer l'effet sur un microorganisme pathogène. Compte tenu de la variabilité des résultats, les réductions obtenues avec un tel traitement combiné (Tableau 14) ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec un traitement thermique seul (Tableau 9), que ce soit immédiatement après traitement comme après 7 jours de conservation. Cependant, lors d'un traitement thermique seul et sur 10 répétitions du même essai, aucun dénombrement bactérien n'est inférieur au seuil de détection. Dans le cas du traitement combiné en revanche, la charge bactérienne est inférieure au seuil de détection dans 1 cas sur 10 immédiatement après traitement et 3 cas sur 10 après 7 jours de conservation. Le seuil de détection étant fortement abaissé grâce à l'utilisation de la technique du MPN, il est raisonnable de conclure que la combinaison des traitements thermique et acide permet vraisemblablement, comme dans le cas de *Listeria innocua*, de bénéficier des avantages respectifs de ces deux types de traitement.

IV. Impact des traitements sur les qualités organoleptiques du produit

IV.1. Teneurs résiduelles en acide lactique

Les teneurs résiduelles en acide lactiques sont présentées dans le Tableau 15. La peau de poulet présente naturellement une certaine quantité d'acide lactique ($90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). On observe un effet apparent de la concentration en acide lactique et de la durée du traitement sur la teneur résiduelle en acide lactique ainsi qu'un effet d'interaction important entre ces deux facteurs. Cependant, la grande variabilité des résultats ne permet pas de différencier les teneurs résiduelles des échantillons traités et des témoins non traités, hormis pour le traitement le plus drastique (10% 30 minutes) pour lequel on retrouve une teneur résiduelle plus de 7 fois supérieure au témoin. L'incertitude sur les teneurs résiduelles en acide lactique pour ce dernier point semble importante, mais cette incertitude augmente de manière linéaire avec la concentration résiduelle moyenne. Ces résultats contrastent avec

ceux de Van der Marel *et al.* (1989) qui observent une différence significative de teneur résiduelle entre des témoins et de la peau de hauts de cuisse traitée 15 secondes avec une solution d'acide à 2% ou 5%, avec $1,98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour l'échantillon traité à l'acide lactique à 2%, contre $1,33 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pour le témoin. Ces différences peuvent être imputées à l'utilisation d'une méthode de mesure distincte induisant des incertitudes plus faibles ou à une irrégularité plus forte de la peau (crevasses, fissures, follicules) chez cet auteur, qui entraînerait une absorption plus importante de l'acide lactique. Des différences de teneur en matière grasse pourraient également modifier l'imprégnation en acide de la peau.

Les mesures de teneur résiduelle en acide lactique effectuées dans notre étude expliquent bien les résultats obtenus lors des essais microbiologiques pour le traitement le plus fort (réduction bactérienne supérieure à $4,59 \text{ log UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour des traitements à 10% durant 30min). La forte teneur résiduelle en acide explique la poursuite de la destruction bactérienne au cours du stockage conduisant, après 7 jours de conservation, à une concentration bactérienne inférieure à $1,67 \text{ log UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Pour le traitement à 10% durant 1 minute, en revanche, la teneur résiduelle en acide lactique n'est pas significativement différente du témoin, bien que l'on observe aussi une poursuite de la destruction bactérienne au cours du stockage. Cela peut s'expliquer par le fait que les bactéries sont concentrées à la surface de la peau. La mesure de la teneur résiduelle en acide lactique s'effectue sur toute l'épaisseur de la peau et sous-estime sans doute la teneur résiduelle en acide lactique réellement présente à la surface au niveau des bactéries. Aucune mesure du coefficient de diffusion de l'acide lactique dans de la peau n'a pu être trouvée dans la littérature. Cependant, après le traitement de hauts de cuisse à l'acide lactique à 5% durant 15 secondes et 3 jours de stockage, Van der Marel *et al.* (1989) observent une augmentation significative de la teneur en acide lactique dans la peau, mais pas dans le muscle sous-jacent, ce qui reste cohérent avec l'hypothèse d'une diffusion lente de l'acide dans la peau.

Il pourrait être intéressant de développer un modèle de type diffusif permettant de prédire les teneurs résiduelles selon la durée du traitement et la concentration de la solution de décontamination mais, il semble plus pertinent d'un point de vue industriel de s'orienter vers des traitements courts, permettant de décontaminer le produit tout en laissant des

teneurs en acide lactique non perceptibles et proches de ce que l'on peut retrouver naturellement sur la peau.

IV.2.Évaluation des effets des traitements thermiques sur la peau

Les effet des traitements thermiques sur la couleur, l'aspect et la texture de la peau, évalués de manière subjective, sont présentés dans le Tableau 16.

Le traitement le plus doux (70°C durant 15 secondes) ne présente aucun effet visible sur la peau et il est impossible de discerner les peaux traitées de peaux fraîches non traitées. Les traitements thermiques appliqués ne modifient pas de manière perceptible la couleur de la peau qui reste très variable d'un animal à l'autre. En ce qui concerne l'aspect général de la peau, il est parfois modifié de manière visible lors des traitements à 98°C ou 100°C durant 10 secondes et 70°C durant 1 minute, la peau pouvant présenter une rétractation ou des boursouflures, probablement liées à la cuisson des protéines du derme. Il faut cependant rappeler que ces traitements thermiques sont appliqués à des disques de peau maintenus de manière relativement faible sur leur support. Dans le cas du traitement thermique de carcasses entières, la peau restant fixée sur le muscle, ces phénomènes de rétractation seraient probablement moins visibles. Les modifications de texture sont perceptibles de manière systématique pour les traitements à 98°C et 100°C durant 10 secondes et sont jugées importantes pour les traitements à 70°C durant 1 minute, la peau pouvant alors être coupée facilement même sans instrument tranchant.

IV.3. Analyse sensorielle

Sur les 10 jurés, 4 détectent l'acide lactique en solution à partir d'une concentration de 0,1% v/v et 6 à partir d'une concentration de 0,05%. Les résultats obtenus lors des essais de dégustation sont récapitulés dans le Tableau 17.

Pour tous les traitements, la valeur de p est très supérieure au seuil de signification (0,05). La proportion de bonnes réponses n'est donc pas significativement différente de ce qui serait théoriquement observé si tous les jurés avaient répondu au hasard (0,33). Aucune différence significative de goût n'a donc été trouvée et ce, quel que soit le traitement appliqué. A notre connaissance, aucune équipe n'a étudié une gamme aussi large de conditions expérimentales. Mais pour les traitements doux, ces résultats correspondent à ceux d'Okolocha *et al.* (2005) pour lesquels le jury trouve acceptable à très acceptable des carcasses de poulet pulvérisées à l'acide lactique à 1% durant 10 secondes, puis grillées. Ils sont aussi en accord avec ceux de l'équipe de Van der Marel *et al.* (1989), dont le jury ne fait pas de préférence et n'observe pas d'arrière-goût entre des témoins et des hauts de cuisse traités durant 15 secondes avec des solutions d'acide lactique à 1%, bien qu'une décoloration significative ait été observée sur les produits crus. L'absence de différence de goût même pour des traitements les plus drastiques confirme que l'acide lactique est un bon candidat pour la décontamination de la surface de carcasses de volaille.

Conclusion

Dans les pays industrialisés, il semble difficile avec les moyens légaux actuels d'améliorer encore de manière significative la qualité sanitaire des carcasses de volaille au travers du contrôle des conditions d'élevage. Dans les pays en voie de développement, ce sont les conditions économiques et climatologiques qui en constituent le frein principal. Or, la prévalence des bactéries pathogènes sur les volailles vendues aux consommateurs s'avère être un réel souci, même dans les pays appliquant les règles d'hygiène les plus strictes. En France, par exemple, ces pathogènes sont responsables de plusieurs morts chaque année. Les contradictions de la littérature et le manque d'attention porté à l'effet de certains traitements sur les qualités sanitaires et les propriétés organoleptiques des produits ne permettent pas d'apporter une solution satisfaisante à ce problème.

C'est dans ce contexte que ce travail a été conduit avec comme objectif de mieux connaître les mécanismes de décontamination de la surfaces des carcasses de volaille en vue de proposer des pistes d'actions pour la mise en place d'un traitement efficace, assurant une réduction significative de la charge bactérienne sur ces carcasses sans modifier leur propriétés sensorielles. Les traitements thermiques par la vapeur et par d'acide lactique, qui semblaient les plus prometteuses, ont été évaluées de façons indépendante et combinée. Les essais, menés à l'échelle du laboratoire dans des conditions maîtrisées, ont permis de quantifier l'effet immédiat du traitement ainsi que l'effet existant après une période de stockage réfrigéré simulant le devenir des produits avant leur vente au consommateur. Afin de s'affranchir de la grande variabilité de la charge bactérienne des carcasses de volaille, l'étude a été conduite sur des disques de peau de poulet inoculés avec de fortes concentrations en *Listeria innocua* puis *Salmonella* Enteritidis.

La décontamination par de la vapeur d'eau a été menée à des températures inférieures à 100°C afin de soumettre le produit à des conditions les plus douces et les moins dénaturantes possibles. Les recherches, tout d'abord conduites sous des jets de vapeur dans un appareil existant à l'INRA de Clermont-Ferrand se sont ensuite poursuivies en utilisant un prototype conçu et construit au CIRAD dans le cadre de ce travail. Les résultats confirment la grande efficacité des traitements thermiques qui permettent de décontaminer rapidement la surface de la peau des volailles. Ils conduisent, sur *Listeria innocua*, à des réductions immédiates de populations de plus de 4,3 log pour des traitement de 10 secondes à des température de surface de 98°C-100°C et de 1,5 log pour des traitement de 15 secondes à 70°C. Les traitements à des températures de jets de vapeur plus faibles, de l'ordre de 70°C peuvent s'avérer très efficaces (réductions de populations supérieures à 5,4 log) mais nécessitent des temps plus longs, de l'ordre de la minute. Quelles que soient les conditions de traitement, une population résiduelle demeure toujours en surface du produit, ce qui correspond au phénomène de traînée décrit dans la littérature sur les produits solides. Cette population résiduelle recolonise la peau des volailles au cours de la conservation au froid et, en sept jours, la charge bactérienne peut ainsi augmenter de plus de 1 log dans les conditions de laboratoire les plus défavorables. Les résultats obtenus sur *Listeria innocua* se confirment sur *Salmonella* Enteritidis où un traitement à la vapeur à 100°C durant 10 secondes autorise des réductions bactériennes immédiates de 3,7 log et de 2,3 log après 7 jours de conservation.

L'utilisation d'acide lactique, couramment employé dans les produits alimentaires, a été privilégiée en raison de son efficacité et de sa flaveur peu prononcée par comparaison à d'autres acides organiques. Dans un premier temps, un domaine expérimental élargi a été parcouru grâce à un plan d'expérience avec des durées de traitement allant de 1 à 30 minutes et des concentrations en acide variant de 2 à 10 %. Les essais se sont ensuite recentrés sur des conditions intermédiaires, plus réalistes d'un point de vue industriel, et présentant *a priori* une bonne efficacité et des teneurs résiduelles en acide négligeables. Ainsi, un traitement avec une solution d'acide lactique à 5% durant 1 minute permet une réduction immédiate de 0,71 log sur *Listeria* et 0,22 log sur *Salmonella*. L'effet immédiat du

traitement n'est réellement important que pour les traitements les plus longs, atteignant 2,66 log pour *Listeria innocua* dans le cas d'un traitement de 30 minutes avec une solution d'acide à 10%. Ces dernière conditions seraient difficiles à mettre en œuvre dans un contexte industriel mais l'intérêt du traitement acide, comme le dévoilent ces résultats, réside beaucoup plus dans l'effet de rémanence spectaculaire qu'il induit et ce, même pour des conditions de traitement modérés. Ainsi, après 7 jours de conservation, les réductions bactériennes obtenues suite à un traitement de 1 minute avec une solution d'acide à 5% dépassent 2,5 log pour *Listeria* et 2,3 log pour *Salmonella*. Bien que la teneur résiduelle en acide lactique ne soit pas significative et n'entraîne aucune modification des propriétés sensorielles du produit, elle permet de poursuivre la décontamination du produit au cours du stockage. Même dans le cas du traitement le plus faible, avec une solution d'acide à 2%, la croissance bactérienne au cours du stockage est inhibée.

Les traitements thermiques et acides sont ainsi complémentaires. La vapeur permet une décontamination immédiate du produit mais ne garantit pas contre une croissance ultérieure des bactéries survivantes. Le traitement acide, pour sa part, ne devient réellement efficace qu'au cours du stockage du produit. Ces deux types de traitements ont donc été appliqués de manière combinée à des peaux de poulet inoculées avec *Listeria innocua*. Ceci a permis de confirmer clairement que les traitements combinés cumulent les avantages de traitements thermiques et chimiques. Le niveau de décontamination est toujours supérieur ou égal à celui de chaque traitement appliqué séparément, que ce soit immédiatement après traitement ou après plusieurs jours de stockage. La trop grande efficacité des traitements thermiques ou acides les plus drastiques ne permet pas d'observer de bénéfice lié à la combinaison des deux types de traitements. En revanche, un effet cumulatif, et même légèrement synergique, a été identifié sur *Listeria innocua* lors de la combinaison de traitements thermiques et chimiques plus doux. Il est donc possible d'obtenir des niveaux de décontamination importants, de 4 log pour *Listeria innocua* et 3 log pour *Salmonella*. Enteritidis tout en utilisant des traitements ne modifiant pas l'aspect ou le goût du produit, et suffisamment rapides pour être applicables sur des chaînes de production. De plus, la charge bactérienne n'augmente pas au cours du stockage.

Ce travail ouvre de nouvelles voies de recherche. Chaque question résolue en soulève d'autres. En ce qui concerne les sujets à approfondir, il est clair qu'une caractérisation thermique plus poussée du pilote utilisée au CIRAD sera nécessaire. La décontamination de *Salmonella Enteritidis* devrait être étudiée dans une plus large gamme de conditions expérimentales tant pour les traitements acides, thermique, et surtout combinés. De même, la mesure des teneurs résiduelles en acide lactique pourrait être affinée, et une véritable quantification de l'effet des traitements sur la texture de la peau serait opportune. Il serait aussi pertinent de conduire des essais complémentaires pour évaluer de façon rigoureuse l'impact de l'épaisseur de la peau des volailles sur l'efficacité du traitement thermique. De manière plus générale, il faudrait étudier l'impact de la charge initiale en micro-organismes de surface sur l'inactivation microbienne et aller plus avant sur les mécanismes de compétition entre flores microbiennes et les inactivations induites.

Les limites de ce travail résident également dans les hypothèses qui en font le fondement. Il a été supposé, plus ou moins implicitement, tout au long de cette thèse que les réductions observées sur des bactéries artificiellement inoculées étaient transposables à la flore pathogène « naturellement » présente à la surface des carcasses de poulet. Les résultats de la littérature semblent supporter cette hypothèse mais elle est très loin d'être complètement prouvée. La vérification stricte de cette hypothèse est impossible avec les techniques de microbiologie classiques mises en œuvre dans le cadre de cette thèse. Cette question scientifique ne pourra être directement tranchée qu'au travers de l'utilisation de techniques microbiologiques plus « pointues » (biologie moléculaire...). Toutefois, la très grande efficacité des traitements, prouvée en laboratoire sur des bactéries inoculées, devrait conduire à des effets de décontamination qui, même s'ils sont atténués sur la flore « naturelle », resteront intéressants à l'échelle industrielle. Ceci est en particulier vrai pour l'effet de rémanence apporté par les traitements acides qui devrait conduire à des allongements importants de la date limite de consommation des produits et une meilleure tolérance aux ruptures de la chaîne du froid.

En termes d'applications industrielle de ce travail, les résultats obtenus révèlent clairement l'intérêt de combiner des traitements par la vapeur et l'acide lactique. Un traitement par de la vapeur à 100°C durant 10 secondes, suivi de l'application d'une solution d'acide lactique à une concentration de 5% durant 1 minute semble particulièrement intéressant. La vérification pratique de ce résultat obtenu en laboratoire sur une flore bactérienne inoculée demanderait de construire un prototype industriel qui permette d'appliquer ces conditions de traitement sur une chaîne d'abattage. Une étude systématique sur des centaines de carcasses permettrait alors une vérification indirecte de l'efficacité du traitement sur la flore « naturellement » présente en surface de ces carcasses.

Mais la construction d'un tel prototype pose un certain nombre de problèmes d'ordre technologique qui n'ont pas été abordés dans cette étude. Ainsi, la mise en œuvre d'un traitement uniforme (vapeur ou acide) sur la totalité d'une carcasse qui présente une géométrie complexe n'est pas triviale et demanderait un travail spécifique.

Dans l'application d'un tel traitement combiné thermique puis acide, un des intérêts du traitement par l'acide serait de refroidir la surface de la carcasse après le traitement par la vapeur afin d'éviter une cuisson de la chair. La gestion de cette solution d'acide lactique est aussi un sujet à part entière. La solution d'acide devra être renouvelée, pour des raisons économiques et environnementales, mais sa stabilité microbiologique devra aussi être assurée dans la mesure où elle se chargera en permanence en bactéries au contact des carcasses. Par ailleurs, si cette étude a permis de définir des traitements de durées compatibles avec les cadences des chaînes d'abattage, leur coût n'a pas été évalué. Il est probablement minime, mais les marges dans l'industrie de la volaille étant particulièrement faibles, il s'agit d'un élément déterminant pour les entreprises.

Il reste donc encore un important travail de développement à effectuer pour pouvoir appliquer ces techniques en abattoir. Mais les résultats obtenus dans cette thèse montrent que ce travail de développement devrait être couronné de succès si les moyens humains et matériels nécessaires étaient mobilisés. Toutefois dans le cadre européen actuel, le problème le plus sensible se situe non pas au niveau technique mais au niveau législatif. Il s'agit de savoir quand l'Union Européenne autorisera-t-elle l'usage des traitements de décontamination en « particuliers chimiques ». Il est probable que de toutes façons des solutions de décontamination devront être mises en place mais serons-nous alors prêts pour proposer une solution douce, plus respectueuse du consommateur et en phase avec les travaux de fond menés sur l'ensemble de la filière au niveau européen, comme alternative aux traitements chlorés ou aux radiations ionisantes tant décriés et pourtant largement appliqués sur d'autres produits ou d'autres continents ?

Références bibliographiques

- Abee, T. et J. A. Wouters (1999). "Microbial stress response in minimal processing." International Journal of Food Microbiology **50**: 65–91.
- Alakomi, H-L.; Skytta, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K.; Helander, I. M. (2000). "Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane." Applied and Environmental Microbiology **66**(5): 2001-2005.
- Aljarallah, K. M. et Adams, M. R. (2007). "Mechanisms of heat inactivation in Salmonella serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures." Journal of Applied Microbiology **102**(1): 153-160.
- Allen, V.M.; Bull, S.A.; Corry, J.E.L.; Domingue, G.; Jorgensen, F.; Frost, J.A.; Whyte, R.; Gonzalez, A.; Elviss, N.; Humphrey, T.J. (2007). "Campylobacter spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation." International Journal of Food Microbiology **113**(1): 54-61.
- Ammor, S.; Chevallier, I.; Laguët, A.; Labadie, J.; Talon, R.; Dufour, E. (2004). "Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and/or pathogenic bacteria." Food Microbiology **21**(1): 11-17.
- Anderson, M. E. et Marshall, R. T. (1989). "Interaction of Concentration and Temperature of Acetic Acid Solution on Reduction of Various Species of Microorganisms on Beef Surfaces." Journal of Food Protection **52**(5): 312-315.
- Anderson, M. E; Marshall, R. T.; Dickson, J. S. (1991). Prediction of Bacterial Penetration into Carcass Tissue during Washing. 37th International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Germany.
- Anderson, M. E.; Marshall, R. T.; Dickson, J. S. (1992). "Estimating Depths of Bacterial Penetration into Post-Rigor Carcass Tissue during Washing." Journal of Food Safety **12**: 191-198.
- Anonymous (1987). "Arrêté interministériel du 08 janvier 1987 relatif à l'emploi de correcteurs d'acidité dans les conserves de viandes et les produits de charcuterie-salaison." Journal officiel "Lois et Décrets" du 16 janvier 1987: 571.
- Anonymous (1988). "Décret n° 88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt." Journal Officiel de la République Française: 16750.
- Anonymous (1999). "Arrêté du 3 juin 1999 relatif à l'emploi de phosphates trisodiques comme auxiliaire technologique pour la réduction de la contamination microbienne des carcasses de volailles." Journal Officiel de la République Française: 8551.
- Anonymous (2002). "Salmonella spp." Fiches de danger biologique - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Anonymous (2003a). "Arrêté du 21 novembre 2003 abrogeant l'arrêté du 3 juin 1999 relatif à l'emploi de phosphates trisodiques comme auxiliaire technologique pour la

- réduction de la contamination microbienne des carcasses de volailles." Journal Officiel de la République Française: 20855.
- Anonymous (2003b). "Morbidity and mortality due to infectious diseases of origin alimentary in France." Rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS).
- Anonymous (2004). "Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale."
- Anonymous (2006a). "*Campylobacter* spp." Fiches de danger biologique - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Anonymous (2006b). "Evaluation of the efficacy of the lactic acid on poultry carcasses." The EFSA Journal **342**: 1-6.
- Anonymous (2006c). "*Listeria monocytogenes*." Fiches de danger biologique - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Anonymous (2007a). "Arrêté du 15 mars 2007 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella* Virchow dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'oeufs de consommation et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D. 223-1 du code rural, dans ces mêmes troupeaux." Journal officiel du 04 Avril 2007.
- Anonymous (2007b). "Arrêté du 15 mars 2007 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella* Virchow dans les troupeaux de reproduction de l'espèce *Gallus gallus* en filière chair et fixant les modalités de déclaration des salmonelloses aviaires, visées à l'article D. 223-1 du code rural, dans ces mêmes troupeaux." Journal officiel du 04 Avril 2007.
- Anonymous (2007c). Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments sur un projet de Règlement relatif à la décontamination des carcasses de volailles. Maisons-Alfort, AFSSA: 21.
- Anonymous (2007d). "Règlement (CE) No 1441/2007 de la commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires." Journal officiel de l'Union Européenne.
- Avens, J.S.; Albright, S.N.; Morton, A.S.; Prewitt, B.E.; Kendall, P.A.; Sofos, J.N. (2002). "Destruction of microorganisms on chicken carcasses by steam and boiling water immersion." Food Control **13**(6-7): 445-450.
- Barbalho, T. C. F.; Almeida, P. F.; Almeida, R. C. C.; Hofer, E. (2005). "Prevalence of *Listeria* spp. at a Poultry Processing Plant in Brazil and a Phage Test for Rapid Confirmation of Suspect Colonies." Food Control **16**: 211-216.
- Bearson, S.M.; Benjamin, W.H.; Swords, W.E.; Foster, J.W. (1996). "Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella* typhimurium." Journal of Bacteriology **178**(9): 2572-2579.

- Begot, C.; Lebert, I.; Lebert, A. (1997). "Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions." Food Microbiology **14**: 403–412.
- Bell, K. Y.; Cutter, C. N.; Sumner, S. S. (1997). "Reduction of foodborne micro-organisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate, and hydrogen peroxide spray washes." Food Microbiology **14**(5): 439-448.
- Brul, S. et P. Coote (1999). "Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms." International Journal of Food Microbiology **50**(1-2): 1-17.
- Bell, K. Y.; Cutter, C. N.; Sumner, S. S. (1990). "Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after Sublethal Heat Shock." Applied and Environmental Microbiology **56**(10): 3216-3219.
- Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; del Camino Garcia-Fernandez, M.; Moreno, B. (2002a). "Activity of trisodium phosphate compared with sodium hydroxide wash solutions against *Listeria monocytogenes* attached to chicken skin during refrigerated storage." Food Microbiology **19**(1): 57-63.
- Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Garcia-Fernandez, M. C.; Moreno, B.. (2002b). "Review: Trisodium Phosphate (TSP) Treatment for Decontamination of Poultry." Food Science & Technology International **8**(1): 11-24.
- Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Rodriguez-Perez, R.; Moreno, B.; Garcia-Fernandez, M. d. C.. (2002c). "Influence of Poultry Carcass Skin Sample Site on the Effectiveness of Trisodium Phosphate against *Listeria monocytogenes*." Journal of Food Protection **65**(5): 853-856.
- Capita, R.; Alonso-Calleja, C.; Prieto, M.; García-Fernández, M. D. C.; Moreno, B.. (2003). "Effectiveness of Trisodium Phosphate against *Listeria monocytogenes* on Excised and Nonexcised Chicken Skin." Journal of Food Protection **66**(1): 61-64.
- Cardinale, E.; Gros-Claude, J. D. P.; Tall, F.; Cisse, M.; Guèye, E. H. F. (2003). "Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal." Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux **56**(1-2): 13-16.
- Carpentier, B. et D. Chassaing (2004). "Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises." International Journal of Food Microbiology **97**(2): 111-122.
- Cason, J. A.; Hinton, A. Jr.; Buhr, R. J. (2004). "Impact of Feathers and Feather Follicles on Broiler Carcass Bacteria." Poultry Science **83**: 1452-1455.
- Chavant, P.; Gaillard-Martinie, B.; Hebraud, M. (2004). "Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase." FEMS Microbiology Letters **236**(2): 241-248.
- Chung, H. J.; Bang, W.; Drake, M. A. (2006). "Stress Response of *Escherichia coli*." COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY **5**: 52-64.
- Corry, J. E. L. et Atabay, H. I. (2001). "Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms." Journal of Applied Microbiology **90**(6): 96-114.
- Corry, J. E. L. et Mead, G. C. (1996). 3. Decontamination of Meat. Microbial Control in the Meat Industry. E. C. A. CT94-1456. Bristol, University of Bristol Press.

- Cotter, P. D. et Hill, C. (2003). "Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH." Microbiology and Molecular Biology Reviews **67**(3): 429–453.
- Crouse, J. D.; Anderson, M. E.; Naumann, H. D. (1988). "Microbial Decontamination and Weight of Carcass as Affected by Automated Washing Pressure and Length of Time Spray." Journal of Food Protection **51**(6): 471-474.
- Cutter, C. N. et Rivera-Betancourt, M. (2000). "Interventions for the reduction of Salmonella Typhimurium DT 104 and non-O157:H7 enterohemorrhagic Escherichia coli on beef surfaces." J Food Prot **63**(10): 1326-32.
- Dalgaard, P. et Jørgensen, L. V. (1998). "Predicted and observed growth of Listeria monocytogenes in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon." International Journal of Food Microbiology **40**(1-2): 105-115.
- Davey, K. R. (1988). A Novel Cabinet for the Hot Water Decontamination of Sides of Beef. 34th International Congress of Meat Science and Technology, brisbane, Australia.
- Davey, K. R. et Smith, M. G. (1989). "A Laboratory Evaluation of a Novel Hot Water Cabinet for the Decontamination of Sides of Beef." International Journal of Food Science and Technology **24**: 305-316.
- Davidson, P. M. et Harrison, M. A. (2002). "Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls." Food Technology **56**(11): 69-78.
- de Koos, J. T. (1992). "Lactic Acid and Lactates. Preservation of Food Products with Natural Ingredients." Food Marketing and Technology **March**: 1-5.
- De Zuniga, A. G.; Anderson, E. M.; Marshall, R. T.; Iannotti, E. L. (1991). "A Model System for Studying the Penetration of Microorganisms into Meat." Journal of Food Protection **54**(4): 256-258.
- Dorsa, W. J.; Cutter, C. N.; Siragusa, G. R. (1997). "Effects of Steam-Vacuuming and Hot Water Spray Wash on the Microflora of Refrigerated Beef Carcass Surface Tissue Inoculated with Escherichia coli O157:H7, Listeria innocua, and Clostridium sporogenes." Journal of Food Protection **60**(2): 114-119.
- Duffy, G.; Ellison, A.; Anderson, W.; Cole, M. B.; Stewart, G. S. A. B. (1995). "Use of Bioluminescence To Model the Thermal Inactivation of Salmonella typhimurium in the Presence of a Competitive Microflora." Applied and Environmental Microbiology **61**(9): 3463-3465.
- Eklund, T. (1983). "The Antimicrobial Effect of Dissociated and Undissociated Sorbic Acid." Journal of Applied Bacteriology **54**: 383-389.
- El-Khateib, T.; Yousef, A. E.; Ockerman, H. W. (1993). "Inactivation and Attachment of Listeria monocytogenes on Beef Muscle Treated with Lactic Acid and Selected Bacteriocins." Journal of Food Protection **56**(1): 29-33.
- Ellerbroek, L. E.; Okolocha, M.; Weise, E. (1996). Factors affecting the microbial quality of meat. Factors affecting the microbial quality of meat. M. H. H. e. C. Rowlings. Bristol, U.K. University of Bristol Press. **4**.
- Firstenberg-Eden, R. (1981). "Attachment of Bacteria to Meat Surfaces : A Review." Journal of Food Protection **44**(8): 602-607.

- Gahan, C. G. M.; O'mahony, J.; Hill, C. (2001). "Characterization of the groESL Operon in *Listeria monocytogenes* : Utilization of Two Reporter Systems (gfp and hly) for Evaluating In Vivo Expression." Infection and Immunity **69**(6): 3924–3932.
- Gandhi, M. et Chikindas, M. L. (2007). "Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive." International Journal of Food Microbiology **113**(1): 1-15.
- Gawande, P. V. et Bhagwat, A. A. (2002). "Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of *Salmonella* spp." Journal of Applied Microbiology **93**(4): 689-696.
- Gaze, J. E.; Boyd, A. R.; Shaw, H. L. (2006). "Heat inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on potato surfaces." Journal of Food Engineering **76**(1).
- Giese, J. (1992). "Experimental Process Reduces *Salmonella* on Poultry." Food Technology **46**(4): 112.
- Gillian, A. F. et O'Beirne, D. (1998). "Effects of the indigenous microflora of minimally processed lettuce on the survival and growth of *Listeria innocua*." International Journal of Food Science and Technology **33**: 477-488.
- Gimenez, B. et Dalgaard, P. (2004). "Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon." Journal of Applied Microbiology **96**(1): 96-109.
- Goepfert, J. M.; Iskander, I. K.; Amundson, C. H. (1970). "Relation of the Heat Resistance of *Salmonellae* to the Water Activity of the Environment." Applied Microbiology **19**(3): 429-433.
- Goncalves, A. C.; Almeida, R. C. C.; Alves, M. A. O.; Almeida, P. F. (2005). "Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *Listeria monocytogenes* populations on chicken breast meat." Food Control **16**(7): 617-622.
- Gonzalez-Fandos, E. et Dominguez, J. L. (2006). "Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage" Journal of Applied Microbiology **101**(6): 1331-1339.
- Graham, A. (1979). "A Hot Shower for Clean Carcasses." Australian Refrigeration Air Conditioning and Heating **33**(3): 33-34.
- Graham, A.; Cain, B. P.; Eustace, I. J. (1978). An Enclosed Hot Water Spray Cabinet for Improved Hygiene of Carcass Meat, CSIRO Meat Research Report No 11/78.
- Greenacre, E. J.; Brocklehurst, T. F.; Waspe, C. R.; Wilson, D. R.; Wilson, P. D. G. (2003). "*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* Acid Tolerance Response Induced by Organic Acids at 20°C: Optimization and Modeling." Applied and Environmental Microbiology **69**(7): 3945-3951.
- Greer, G. G. et Dilts, B. D. (1992). "Factors Affecting the Susceptibility of Meat borne Pathogens and Spoilage Bacteria to Organic Acids." Food Research International **25**: 355-364.
- Gudbjornsdottir, B.; Suihko, M.-L.; Gustavsson, P.; Thorkelsson, G.; Salo, S.; Sjoberg, A.-M.; Niclasen, O.; Bredholt, S. (2004). "The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries." Food Microbiology **21**(2): 217-225.

- Hartwig, P. et McDaniel, M. R. (1995). "Flavor Characteristics of Lactic, Malic, Citric, and Acetic Acids at Various pH Levels." Journal of Food Science **60**(2): 384-388.
- Hill, C.; Cotter, P. D.; Sleator, R. D.; Gahan, C. G. M. (2001). "Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing." International Dairy journal **12**(2-3): 273-283.
- Hill, C.; O'Driscoll, B.; Booth, I. (1995). "Acid adaptation and food poisoning microorganisms." International Journal of Food Microbiology **28**: 245-254.
- Hinton, J. Arthur et Ingram, K. D. (2003). "Bactericidal activity of tripotassium phosphate and potassium oleate on the native flora of poultry skin." Food Microbiology **20**(4): 405-410.
- Hoke, K.; Houska, M.; Kyhos, K.; Landfeld, A.; Pipek, P. (2003). "Modelling of beef surface temperatures during steam decontamination." Journal of Food Engineering **58**(1): 95-102.
- Humpheson, L.; Adams, M. R.; Anderson, W. A.; Cole, M. B.. (1997). "Biphasic Thermal Inactivation Kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4." Applied and Environmental Microbiology **64**(2): 459-464.
- Hwang, C.-a. et Beuchat, L. R. (1995). "Efficacy of a lactic acid/sodium benzoate wash solution in reducing bacterial contamination of raw chicken." International Journal of Food Microbiology **27**(1): 91-98.
- Hwang, C. et Beuchat, L. R. (1994). "Efficiency of Selected Chemicals for Killing Pathogenic and Spoilage Microorganisms on Chicken." Journal of Food Protection **58**(1): 19-23.
- Ingram, M.; Ottawa, F. J. H.; Coppice, J. B. M. (1956). "The Preservative Action of Acid Substances in Food." Chemistry and Industry **42**: 1154-1163.
- James, C.; Goksoy, E. O.; Corry, J. E. L.; James, S. J. (2000a). "Surface pasteurisation of poultry meat using steam at atmospheric pressure." Journal of Food Engineering **45**(2): 111-117.
- James, C.; Thornton, J. A.; Ketteringham, L.; James, S. J. (2000b). "Effect of steam condensation, hot water or chlorinated hot water immersion on bacterial numbers and quality of lamb carcasses." Journal of Food Engineering **43**(4): 219-225.
- James, C. et James, S. J. (1997). Meat Decontamination - the State of the Art. Bristol, European Commission - MAFF Advanced Fellowship in Food Process Engineering - University of Bristol: 140p.
- James, S. J. et Evans, J. A. (2006). "Predicting the reduction in microbes on the surface of foods during surface pasteurisation--the 'BUGDEATH' project." Journal of Food Engineering (Bugdeath) **76**(1): 1-6.
- Jefferson, K. K. (2004). "What drives bacteria to produce a biofilm?" FEMS Microbiology Letters **236**(2): 163-173.
- Juneja, V. K.; Eblen, B. S.; Marks, H. M. (2001). "Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of *Salmonella* in poultry of different fat levels." International Journal of Food Microbiology **70**(1-2): 37-51.

- Kim, K. Y.; Frank, J. F.; Craven, S. E. (1996). "Three-dimensional visualization of Salmonella attachment to poultry skin using confocal scanning laser microscopy." Letters In Applied Microbiology **22**(4): 280-282.
- Klose, A. A.; Kaufmann, V. F.; Bayne, H. G.; Pool, M. F. (1971). "Pasteurization of Poultry Meat by Steam Under Reduced Pressure." Poultry Science **50**: 1156-1160.
- Kochevar, S. L.; Sofos, J. N.; LeValley, S. B.; Smith, G. C. (1997). "Effect of water temperature, pressure and chemical solution on removal of fecal material and bacteria from lamb adipose tissue by spray-washing." Meat Science **45**(3): 377-388.
- Kondjoyan, A.; McCann, M. S.; Rouaud, O.; Havet, M.; Foster, A. M.; Swain, M.; Daudin, J. D. (2006). "Modelling coupled heat–water transfers during a decontamination treatment of the surface of solid food products by a jet of hot air—II. Validations of product surface temperature and water activity under fast transient air temperature conditions." Journal of Food Engineering **76**(1): 63-69.
- Kondjoyan, A. et Portanguen, S. (2008a). "Effect of superheated steam on the inactivation of *Listeria innocua* surface-inoculated onto chicken skin." Journal of Food Engineering **87**(2): 162-171.
- Kondjoyan, A. et Portanguen, S. (2008b). "Prediction of surface and “under surface” temperatures on poultry muscles and poultry skins subjected to jets of superheated steam." Food Research International **41**(1): 16-30.
- Koutsoumanis, K. P.; Kendall, P. A.; Sofos, J. N. (2003). "Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*." Applied and Environmental Microbiology **69**(12): 7514-7516.
- Koutsoumanis, K. P. et Sofos, J. N. (2004). "Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions." Letters of Applied Microbiology **38**(4): 321-326.
- Kozempel, M.; Goldberg, N.; Radewonuk, E. R.; Scullen, O. J. (2000). "Commercial Testing And Optimization Studies Of The Surface Pasteurization Process Of Chicken." Journal of Food Process Engineering **23**(5): 387-402.
- Kozempel, M.; Goldberg, N.; Radewonuk, E. R.; Scullen, O. J. (2001a). "Modification of the VSV Surface Pasteurizer to Treat the Visceral Cavity and Surfaces of Chicken Carcasses." Journal of Food Science **66**(7): 954-959.
- Kozempel, M. F.; Marshall, D. L.; Radewonuk, E. R.; Scullen, O. J.; Goldberg, N.; Bal'a, M. F. A. (2001b). "A Rapid Surface Intervention Process to Kill *Listeria innocua* on Catfish Using Cycles of Vacuum and Steam." Food microbiology and Safety **66**(7): 1012-1016.
- Lee, I. S.; Slonczewski, J. L.; Foster, J. W. (1994a). "A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Salmonella typhimurium*." Journal of Bacteriology **176**(5): 1422-1426.
- Lee, R. M.; Hartman, P. A.; Olson, D. G.; Williams, F. D. (1994b). "Bactericidal and Bacteriolytic Effects of Selected Food-Grade Phosphates Using *Staphylococcus aureus* as a Model System." Journal of Food Protection **57**(6): 276-283.

- Lin, J.; Smith, M. P.; Chapin, K. C.; Baik, H. S.; Bennett, G. N.; Foster, J. W. (1996). "Mechanisms of Acid Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*." Applied and Environmental Microbiology **62**(9).
- Logue, C. M.; Sheridan, J. J.; Harrington, D. (2004). "Studies of steam decontamination of beef inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and its effect on subsequent storage." Journal of Applied Microbiology **98**(3): 741-751.
- Lou, Y. et Yousef, A. E. (1997). "Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors." Applied and Environmental Microbiology **63**(4).
- Malbrancq, Y. et Kondjoyan, A. (2004). Analyse et modélisation du transferts de chaleur à la surface de produits alimentaires solides soumis à un jet de vapeur surchauffée. Congrès Français de Thermique. Presqu'île de Giens, FRANCE.
- Mattick, K. L.; Jørgensen, F.; Legan, J. D.; Cole, M. B.; Porter, J.; Lappin-Scott, H. M.; Humphrey, T. J. (2001). "Survival and Filamentation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 at Low Water Activity." Applied and Environmental Microbiology **66**(4): 1274-1279.
- McCann, M. S.; McGovern, A. C.; McDowell, D. A.; Blair, I. S.; Sheridan, J. J. (2006a). "Surface decontamination of beef inoculated with *Salmonella* Typhimurium DT104 or *Escherichia coli* O157:H7 using dry air in a novel heat treatment apparatus." Journal of Applied Microbiology **101**(5): 1177-1187.
- McCann, M. S.; Sheridan, J. J.; McDowell, D. A.; Blair, I. S. (2006b). "Effects of steam pasteurisation on *Salmonella* Typhimurium DT104 and *Escherichia coli* O157:H7 surface inoculated onto beef, pork and chicken." Journal of Food Engineering (Bugdeath) **76**(1): 32-40.
- McMeechan, A.; Roberts, M.; Cogan, T. A.; Jørgensen, F.; Stevenson, A.; Lewis, C.; Rowley, G.; Humphrey, T. J.. (2007). "Role of the alternative sigma factors σ^E and σ^S in survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during starvation, refrigeration and osmotic shock." Microbiology **153**: 263-269.
- Mena, C.; Almeida, G.; Carneiro, L.; Teixeira, P.; Hogg, T.; Gibbs, P. A. (2004). "Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal." Food Microbiology **21**(2): 213-216.
- Miller, A. J.; Bayles, D. O.; Eblen, B. S. (2000). "Cold Shock Induction of Thermal Sensitivity in *Listeria monocytogenes*." Applied and Environmental Microbiology **66**(10).
- Miller, F. A.; Brandao, T. R. S.; Teixeira, P.; Silva, C. L. M. (2006). "Recovery of heat-injured *Listeria innocua*." International Journal of Food Microbiology **112**(3): 261-265.
- Morgan, A. I.; Goldberg, N.; Radewonuk, E. R.; Scullen, O. J. (1996a). "Surface Pasteurization of Raw Poultry Meat by Steam." Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **29**(5-6): 447-451.
- Morgan, A. I.; Radewonuk, E. R.; Scullen, O. J. (1996b). "Ultra High Temperature, Ultra Short Time Surface Pasteurization of Meat." Journal of Food Science **61**(6): 1216-1218.

- Murphy, R. Y.; Marks, B. P.; Johnson, E. R.; Johnson, M. G. (2000). "Thermal Inactivation Kinetics of Salmonella and Listeria in Ground Chicken Breast Meat and Liquid Medium." Journal of Food Science **65**(4): 706-710.
- Murphy, R. Y.; Beard, B. L.; Martin, E. M.; Duncan, L. K.; Marcy, J. A. (2004). "Comparative Study of Thermal Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Listeria monocytogenes in Ground Pork." Journal of Food Science **69**(4): 97-101.
- Nissen, H.; Maugesten, T.; Lea, P. (2001). "Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella enteritidis* on decontaminated and untreated meat." Meat Science **57**(3): 291-298.
- Okolocha, E. C. et Ellerbroek, L. (2005). "The Influence of Acid and Alkaline Treatments on Pathogens and the Shelf Life of Poultry Meat." Food Control **16**: 217-225.
- Orta-Ramirez, A.; Marks, B. P.; Warsow, C. R.; Booren, A. M.; Ryser, E. T. (2005). "Enhanced Thermal Resistance of Salmonella in Whole Muscle Compared to Ground Beef." Journal of Food Science **70**(7): 359-362.
- Ozdemir, H.; Yildirim, Y.; Kuplulu, O.; Koluman, A.; Goncuoglu, M.; Inat, G. (2006). "Effects of lactic acid and hot water treatments on Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes on beef." Food Control **17**(4): 299-303.
- Pagán, R.; Condón, S.; Sala, F. (1997). "Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of Listeria monocytogenes." Applied and Environmental Microbiology **63**(8): 3225-3232.
- Pipek, P.; Houska, M.; Hoke, K.; Jelenikova, J.; Kyhos, K.; Sikulova, M. (2006). "Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid." Journal of Food Engineering **74**(2): 224-231.
- Pipek, P.; Houska, M.; Jelenikova, J.; Kyhos, K.; K., H.; Sikulova, M. (2005). "Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray." Journal of Food Engineering **67**: 309-315.
- Rathgeber, B. M. et Waldroup, A. L. (1995). "Antibacterial Activity of a Sodium Acid Pyrophosphate Product in Chiller Water Against Selected Bacteria on Broiler Carcasses." Journal of Food Protection **58**(5): 530-534.
- Reagan, J. O.; Acuff, G. R.; Buege, D. R.; Buyck, M. J.; Dickson, J. S.; Kastner, C. L.; Marsden, J. L.; Morgan, J. B.; Nickelson, I. R.; Smith, G. C.; Sofos, J. N. (1996). "Trimming and Washing of Beef Carcasses as a Method of Improving the Microbiological Quality of Meat." Journal of Food Protection **59**(7): 751-756.
- Ross, T.; Dalgaard, P.; Tienungoon, S. (2000). "Predictive modelling of the growth and survival of Listeria in fishery products." International Journal of Food Microbiology **62**: 231-232.
- Samelis, J.; Ikeda, J. S.; Sofos, J. N. (2003). "Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7." Journal of Applied Microbiology **95**(3): 563-575.
- Samelis, J.; Sofos, J. N.; Kendall, P. A.; Smith, G. C. (2001). "Influence of the Natural Microbial Flora on the Acid Tolerance Response of Listeria monocytogenes in a Model System

- of Fresh Meat Decontamination Fluids." Applied and Environmental Microbiology **67**(6): 2410-2420.
- Selgas, D.; Marín, M. L.; Pin, C.; Casas, C. (1993). "Attachment of Bacteria to Meat Surfaces : A Review." Meat Science **34**: 265-273.
- Shin, J.-H.; Lee, S.-Y.; Dougherty, R. H.; Rasco, B.; Kang, D.-H. (2006). "Combined effect of mild heat and acetic acid treatment for inactivating Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium in an asparagus puree." Journal of Applied Microbiology **101**: 1140–1151.
- Skandamis, P. N.; Yoon, Y.; Stopforth, J. D.; Kendall, P. A.; Sofos, J. N. (2008). "Heat and acid tolerance of Listeria monocytogenes after exposure to single and multiple sublethal stresses." Food Microbiology **25**(2): 294-303.
- Smelt, J. P. P. M.; Hellemons, J. C.; Wouters, P. C.; Gerwen, S. J. C. V. (2002). "Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means." International Journal of Food Microbiology **78**(1-2): 57-77.
- Smith, M. G. et Graham, A. (1978). "Destruction of Escherichia coli and Salmonellae on Mutton Carcasses by Treatment with Hot Water." Meat Science **2**: 119-128.
- Smulders, F. J. M. (1995). Preservation by Microbial Decontamination; The Surface Treatments of Meats by Organic Acids. New Methods of Food Preservation. Gould. Amsterdam - New-York - Oxford, Elsevier. **Chapter 12**: 253-282.
- Sörqvist, S. (2003). "Heat Resistance in Liquids of Enterococcus spp. Listeria spp. Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Salmonella spp. and Campylobacter spp." Acta vet. scand. **44**: 1-19.
- Speranza, G.; Gottardi, G.; Pederzoli, C.; Lunelli, L.; Canteri, R.; Pasquardini, L.; Carli, E.; Lui, A.; Maniglio, D.; Brugnara, M.; Anderle, M. (2004). "Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces." Biomaterials **25**(11): 2029-2037.
- Techasena, O. et Flick, D. (1995). "Surface temperature estimation of solid foods during a surface sterilization." Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie **28**(4): 419-424.
- Uyttendaele, M. R.; Neyts, K. D.; Lips, R. M.; Debevere, J. M. (1997). "Incidence of Listeria monocytogenes in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abbatoirs." Food Microbiology **14**(4): 339-346.
- Uyttendaele, M. R.; Debevere, J. M.; Lips, R. M.; Neyts, K. D. (1998). "Prevalence of Salmonella in poultry carcasses and their products in Belgium." International Journal of Food Microbiology **40**(1-2): 1-8.
- Valdramidis, V. P.; Geeraerd, A. H.; Bernaerts, K.; Impe, J. F. V. (2006). "Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction." Innovative Food Science & Emerging Technologies **7**(1-2): 80-87.
- Valdramidis, V. P.; Péroval, C.; Portanguen, S.; Verhulst, A. J.; Impe, J. F. M. V.; Geeraerd, A. H.; Kondjoyan, A. (2007). "Quantitative Evaluation of Thermal Inactivation Kinetics of Free-Floating Versus Surface-Attached Listeria innocua Cells." Food and Bioprocess Technology **in press**.
- Van Der Marel, G. M.; De Vries, A. W.; Van Logtestijn, J. G.; Mossel, D. A. A. (1989). "Effect of lactic acid treatment during processing on the sensory quality and lactic acid content

- of fresh broiler chickens." International Journal of Food Science and Technology **24**: 11-16.
- Van Netten, P.; Valentijn, A.; Mossel, D. A. A.; J., Huis in't Veld, J. H. J. (1997). "Fate of Low Temperature and Acid-Adapted *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* that Contaminate Lactic Acid Decontaminated Meat During Chill Storage." Journal of Applied Microbiology **82**: 769-779.
- Van Netten, P.; Valentijn, A.; Mossel, D. A. A.; Huis in't Veld, J. H. J. (1998). "The survival and growth of acid-adapted mesophilic pathogens that contaminate meat after lactic acid decontamination." Journal of Applied Microbiology **84**(4): 559-567.
- Wang, G. et Doyle, M. P. (1998). "Heat shock response enhances acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7." Letters in Applied Microbiology **26**: 31-34.
- Ward, O. C.; Logue, C. M.; Sheridan, J. M. A. (2000). A Test Bacterial Decontamination System for Meat Products. Dublin, Teagasc: 14.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H.; Wouters, J. A.; Leeuw, P. P. L. A. d.; Hain, T.; Chakraborty, T.; Abee, T. (2004). "Identification of Sigma Factor σ^B -Controlled Genes and Their Impact on Acid Stress, High Hydrostatic Pressure, and Freeze Survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e." Applied and Environmental Microbiology **70**(6): 3457-3466.
- Whyte, P.; McGill, K.; Collins, J. D. (2003). "An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses." Food Microbiology **20**(1): 111-117.

Glossaire

ADN	Acide DésoxyRiboNucléique.
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
ANOVA	ANalysis Of Variance, analyse de la variance.
AR	Acid Response. Réponse au traitement acide
ASP	Acid Shock Protein, protéine de choc acide.
ATP	Adénosine TriPhosphate.
ATR	Acid Tolerance Response Tolérance de la réponse bactérienne à un choc acide
a_w	Activité de l'eau.
cfu	Colony Forming Unit, voir UFC.
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.
CSP	Cold Shock Protein, protéine de choc froid.
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique.
EFSA	European Food Safety Agency, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments.
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point, Analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise. Système qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments.
HSP	Heat Shock Protein, protéine de choc thermique.

INRA	Institut National de la Recherche Agronomique.
InVS	Institut de Veille Sanitaire.
LSD	Least Significant Difference, plus petite différence significative.
MPN	Most Probable Number, nombre le plus probable.
MSRV (milieu)	Modified Semi-solid Rapapport Vassiliadis medium, milieu de Rapapport-Vassiliadis Modifié Semi-solide, utilisé pour l'identification et le dénombrement de <i>Salmonella</i> Enteritidis.
PTFE	PolyTétraFluorEthylène, plus connu sous le nom de Téflon®.
TIA	Toxi-Infection Alimentaire.
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective.
TSP	Triphosphate de Sodium.
UFC	Unité formant colonie..
USDA	United States Department of Agriculture.

Table des illustrations

Figure 1. Insertions de la plume dans le follicule plumeux, coupe transversale. © Biodidac.

Figure 2. Nombre moyen de bactéries survivantes pour un traitement à 60°C en milieu liquide, présentant les droites de tendance pour la population « classique » et la population « résistante ». (Humpheson *et al.* 1997)

Figure 3. Évolution de la concentration en *Salmonella* Typhimurium DT104 (cercles), température de surface (triangles) et de l' a_w (traits pointillés) de surface de bœuf lors d'un traitement à l'air chaud. La température de l'air augmente durant les 38 premières secondes du traitement (ligne pointillée verticale), puis est maintenue constante et égale à 100°C (McCann *et al.* 2006a).

Figure 4. Concentration en *Campylobacter jejuni* AR6 (losanges) et *Escherichia coli* K12 (carrés) à la surface de peau de poulets en fonction de la durée d'un traitement à la vapeur à 100°C (James et Evans, 2006).

Figure 5. Concentration en *Escherichia coli* O157:H7 inoculées à la surface de peaux de poulets soumises à un traitement par la vapeur à 100°C (McCann *et al.* 2006b).

Figure 6. Concentration en *Salmonella* Typhimurium DT104 inoculées à la surface de peaux de poulets soumises à un traitement par la vapeur à 100°C (McCann *et al.* 2006b).

Figure 7. Évolution de la flore totale aérobie mésophile naturellement présente à la surface de carcasses de poulet au cours d'un traitement par la vapeur à une température de 96°C-100°C (Avens *et al.* 2002).

Figure 8. Dispositif de traitement par de la vapeur sous pression, utilisé par Morgan *et al.* (1996). « Rotor » : chambre rotative, « Vacuum » : chambre sous vide, « Treat » : chambre contenant la vapeur sous pression (Morgan *et al.* 1996a).

Figure 9. Température à la surface de peaux de poulets soumises à des jets de vapeur surchauffée à différentes températures : 434°C (1), 340°C (2), 249°C (3), 218°C (4) et 151°C (5). (Kondjoyan et Portanguen, 2008b)

Figure 10. Concentration en *Listeria innocua* CLIP 20-595 à la surface de peaux de poulets soumises à des jets de vapeur surchauffée soit à une température de 160-180°C (carrés, trait pointillé) soit à une température de 400-450°C (triangles, trait plein). (Kondjoyan et Portanguen, 2008a).

Figure 11. Schéma de principe des essais de décontamination

Figure 12. Évolution de la concentration bactérienne d'une culture de *Listeria innocua* en fonction de la durée d'incubation à 37°C.

Figure 13. Évolution de la densité optique d'une culture de *Salmonella* Enteritidis en fonction de la durée d'incubation à 37°C.

Figure 14. Schéma du dispositif d'inoculation/traitement utilisé au CIRAD. Support rigide en PTFE (A), papier sulfurisé (B), peau de poulet (C), coupelle en acier inoxydable (D), système de fixation à serre-joints (E), bouchon silicone (F).

Figure 15. Porte-échantillon en acier inoxydable utilisé lors de l'inoculation des peaux de poulet et des essais thermique et combiné effectués au CIRAD. Base pleine (A), Système de fixation (B), Échantillon à traiter (C), Porte-échantillon complet (D).

Figure 16. Dispositif de traitement thermique utilisé à l'INRA de Theix. Porte-échantillon et échantillon (A), thermocouple (B), pyromètre infrarouge (C), acquisition des températures (D), générateur de vapeur (E), tube de surchauffe (F), résistance de surchauffe et régulation (G), tube de Ranque-Hilsch (H). Positions du porte-échantillon : zone de chargement (1), jet de vapeur (2), refroidissement (3). La distance entre la sortie de la buse de vapeur et l'échantillon est représentée par (d).

Figure 17. Schéma du pilote de traitement thermique utilisé au CIRAD. Enceinte (A), isolation thermique (B), tiroir (C), résistance de chauffage de l'enceinte (D), évacuation surplus de vapeur (E), régulateur des résistances (F), générateur de vapeur (G), tube de surchauffe (H), résistance de surchauffe de la vapeur (I), thermocouples (J) : T1 température de surface, T2 température au-dessus de l'échantillon, T3 température sous l'échantillon)

Figure 18. Principe de la méthode de dénombrement utilisée au CIRAD lors des essais de traitement thermique et combiné

Figure 19. Exemple de boîtes de milieu MSRV, avant (gauche) et après (droite) incubation.

Figure 20. Exemple de températures de surface mesurées lors d'un traitement thermique à 98°C (trait pointillé) et à 70°C (trait plein) de peaux de poulet inoculées avec *Listeria innocua*. Le traitement thermique commence deux secondes après le début de l'acquisition.

Figure 21. Exemple de températures mesurées par un thermocouple posé sur la surface de la peau de poulet (trois répétitions différentes, traits pleins), et températures mesurées pour un essai en l'absence d'échantillon (trait en pointillés), lors d'un traitement de 10 secondes à une température de vapeur de 100°C. Cette figure illustre l'impossibilité de mesurer correctement la température en surface de l'échantillon en se contentant de placer un thermocouple au contact de la peau.

Figure 22. Concentrations en *Listeria innocua* survivantes immédiatement après un traitement thermique à 98°C durant 10 secondes (triangles) et un traitement à 70°C durant 1 minute (cercles) représentées en fonction de l'épaisseur de la peau de l'échantillon.

Figure 23. Concentration moyenne en *Listeria innocua* CLIP 20-595 à la surface de témoins non traités (ronds, ligne pointillée) et sur des peaux traitées avec une solution d'acide lactique à 5% durant 1 minute (carrées, ligne pleine), pour différentes durées de stockage à 4°C. Barres d'erreur : intervalle de confiance à 95%. Les histogrammes représentent la réduction décimale. Cinq répétitions ont été effectuées par condition expérimentale. Les peaux ont été inoculées avec un mélange de *Listeria innocua*, *Salmonella* Enteritidis et *Campylobacter jejuni*.

Figure 24. Concentration moyenne en *Salmonella* Enteritidis CIP 82.97 à la surface de témoins non traités (ronds, ligne pointillée) et sur des peaux traitées avec une solution d'acide lactique à 5% durant 1 minute (carrées, ligne pleine), pour différentes durées de stockage à 4°C. Barres d'erreur : intervalle de confiance à 95%. Les histogrammes représentent la réduction décimale. Cinq répétitions par condition expérimentale, inoculation des peaux avec un mélange de *Listeria innocua*, *Salmonella* Enteritidis et *Campylobacter jejuni*.

Liste des tableaux

Tableau 1. Estimation du nombre annuel moyen de cas, de cas hospitalisés, et de décès par infections d'origine alimentaire causées par *Campylobacter* spp. *Salmonella* spp. (hors *S. Typhi*) et *Listeria monocytogenes* en France métropolitaine dans les années 1990. (Anonymous, 2003b)

Tableau 2. Principales caractéristiques de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. et *Campylobacter jejuni*.

Tableau 3. Critères de sécurité des denrées alimentaires en vigueur dans l'Union Européenne (Anonymous, 2007d).

Tableau 4. Quelques exemples des réductions décimales obtenues lors de l'utilisation de solutions de décontamination simples sur des volailles.

Tableau 5. Exemples de valeurs de D_T et de z mesurées pour les bactéries fréquemment trouvées sur la volaille lorsqu'elles sont inoculées soit en milieu liquide soit en milieu solide.

Tableau 6. Valeur des paramètres de la relation Eqn 3 utilisés par McCann *et al.* (2006b) pour décrire leurs résultats expérimentaux.

Tableau 7. Conditions expérimentales des essais de traitements thermiques menés respectivement à l'INRA et au CIRAD et protocoles de dénombrement utilisés. * MPN : Most Probable Number, cf V.2 ci-dessus.

Tableau 8. Concentrations en *Listeria innocua* et réductions décimales observées après des traitements thermiques réalisés soit à une température de 98°C -100°C pendant 10 secondes soit à 70°C pendant 15 secondes ou 1 minutes. Tous les essais ont été répétés 10 fois à l'exception de ceux marqués en gras (100°C, 10s réalisés au CIRAD) qui n'ont été répétés que 5 fois.

Tableau 9. Concentrations en *Salmonella* Enteritidis et réductions décimales observées après des traitements thermiques réalisés à une température de 100°C pendant 10 secondes. Tous les essais ont été répétés 10 fois.

Tableau 10. Concentrations en *Listeria innocua* et réductions décimales à T0 en fonction de la durée du traitement et de la concentration en acide lactique. Les essais réalisés à l'INRA de Theix sont indiqués en gras (10 répétitions). Les essais réalisés au CIRAD-Réunion sont indiqués en fonte normale (3 répétitions). Dans une même colonne, les lignes présentant des exposants dont les lettres sont différentes (a, b) sont significativement différentes.

Tableau 11. Effets et seuils de signification des différents facteurs du modèle de réduction bactérienne à T0. Seuil de significativité : $p > 0,05$ (-), $p < 0,05$ (*), $p < .01$ (**), $p < 0,001$ (***). Coefficient de régression du modèle : 0,90.

Tableau 12. Concentrations en *Listeria innocua* CLIP 20-595 et réductions décimales à T7 en fonction de la durée du traitement et de la concentration en acide lactique. Les essais réalisés à l'INRA de Theix sont indiqués en gras (10 répétitions). Les essais réalisés au CIRAD-Réunion sont indiqués en fonte normale (3 répétitions). Dans une même colonne, les lignes présentant des exposants différents (a, b) sont significativement différentes. Les peaux ont été inoculées avec *Listeria innocua* uniquement.

Tableau 13. Concentrations en *Listeria innocua* et réductions décimales observées après des traitements thermiques à 98°C et 70°C suivis de traitements avec des solutions d'acide lactique à 5% et 10%.

Tableau 14. Concentrations en *Salmonella* Enteritidis et réductions décimales observées après un traitement combiné (traitement thermique à 100°C durant 10 s, traitement acide à 5% durant 1 min). Les essais ont été répétés 10 fois.

Tableau 15. Teneurs résiduelles en acide lactique au sein de la peau de poulet après différents traitements de décontamination utilisant cet acide. Dans une même colonne, les lignes présentant des exposants différents (a, b) sont significativement différentes.

Tableau 16. Effet des traitements thermiques sur la couleur, l'aspect général et la texture de la peau. + : pas de modification visible, - : modification visible, - - : modification importante. Les essais indiqués en gras ont été réalisés à l'INRA de Theix.

Tableau 17. Nombre de jurés ayant correctement différencié le morceau traité des deux témoins. Une valeur de p inférieure ou égale au seuil de significativité (0,05) indiquerait que les jurés identifient correctement l'échantillon traité et ne répondent pas au hasard.

Annexe. Code source de la macro « MPN.xla »

```
'Définition des conditions initiales
Lambda = 1
Count = 0

'Calcul du membre de droite (constant)
Droite = 0
For j = 1 To k
Droite = Droite + (Nbe_Tubes(j) * Qte_Ech(j))
Next j

'Calcul du minimum : un seul tube, à la dilution la plus forte est positif
Mini = 1 / (Nbe_Tubes(1) * Qte_Ech(1))

'Calcul du maximum : tous les tubes sont positifs
Maxi = 0
For j = 1 To k
Maxi = Maxi + (1 / Qte_Ech(j))
Next j

'Contrôle de la validité des données entrées
Donnees_Valides = True
For j = 1 To k
If Nbe_Positifs(j) > Nbe_Tubes(j) Then Donnees_Valides = False
Next j

'Est-il nécessaire de calculer le MPN ?
If Donnees_Valides = False Then
MPN = "Nb Tubes positifs > Nb Tubes : ERREUR"
ElseIf Application.WorksheetFunction.Sum(Nbe_Positifs) = 0 Then
MPN = "< " & Mini
ElseIf Application.WorksheetFunction.Sum(Nbe_Positifs) =
Application.WorksheetFunction.Sum(Nbe_Tubes) Then
MPN = "> " & Maxi
Else

La = Mini / 10
Lb = Maxi + 1

'Calcul du MPN : itérations
Do

'Définition des conditions initiales
Ga = 0
Gb = 0
Gm = 0
Lm = (La + Lb) / 2

'Calcul de la partie Gauche pour un Lambda donné
For j = 1 To k
```

```

Ga = Ga + (Nbe_Positifs(j) * Qte_Ech(j)) / (1 - Exp(-La * Qte_Ech(j)))
Gb = Gb + (Nbe_Positifs(j) * Qte_Ech(j)) / (1 - Exp(-Lb * Qte_Ech(j)))
Gm = Gm + (Nbe_Positifs(j) * Qte_Ech(j)) / (1 - Exp(-Lm * Qte_Ech(j)))
Next j

'On soustrait la partie droite car x-y=0 est + facile à trouver que x=y
Ga = Ga - Droite
Gb = Gb - Droite
Gm = Gm - Droite

'Décalage du Lambda selon le résultat du calcul

If (Ga * Gm) < 0 Then
Lb = Lm
ElseIf (Gb * Gm) < 0 Then
La = Lm
End If

'contrôler que l'on n'est pas dans une boucle infinie
Count = Count + 1
If Count > 100000 Then Exit Do

Loop Until Abs(La - Lb) < Epsilon

If Count < 100000 Then
MPN = Lm
Else
MPN = "Pas de solution : ERREUR"
End If

End If

End Function

```

DÉCONTAMINATION DE PEAUX DE VOLAILLES PAR UTILISATION D'UNE SOLUTION D'ACIDE LACTIQUE ET DE VAPEUR D'EAU. EFFET DES TRAITEMENTS SEULS OU COMBINÉS

Résumé : Les carcasses de volaille sont fortement chargées en bactéries, parmi lesquelles se retrouvent fréquemment des bactéries pathogènes appartenant aux genres *Listeria*, *Salmonella* et *Campylobacter*. Deux techniques de décontamination, thermique et chimique ont donc été étudiées, seules ou en combinaison, sur des surfaces de peau de poulet inoculées avec *Listeria innocua* et *Salmonella* Enteritidis. Le traitement chimique utilise des solutions d'acide lactique, sans risque pour la santé humaine. Le traitement thermique fait appel à des jets de vapeur. L'objectif de ce travail de thèse est d'approfondir les mécanismes responsables des décontaminations, et de définir un domaine de traitement permettant de réduire efficacement la charge bactérienne en surface des carcasses sans en modifier les propriétés organoleptiques de manière significative.

Les traitements thermiques et acides s'avèrent complémentaires. La vapeur permet une décontamination immédiate du produit mais ne garantit pas l'absence de croissance ultérieure des bactéries survivantes. Le traitement acide, pour sa part, ne devient réellement efficace qu'au cours du stockage du produit. Il est ainsi possible d'obtenir des niveaux de décontamination importants, de 4 log pour *Listeria innocua* et 3 log pour *Salmonella* Enteritidis sans modifier l'aspect ou le goût du produit.

Mots-clefs : Décontamination, Volaille, Acide Lactique, Vapeur, Traitements combinés, *Listeria*, *Salmonella*.

POULTRY SKIN DECONTAMINATION USING A LACTIC ACID SOLUTION AND STEAM. IMPACT OF THE TREATMENTS USED ALONE OR IN COMBINATION.

Abstract: Raw poultry carcasses are heavily contaminated with bacteria, often including pathogens belonging to the genera *Listeria*, *Salmonella* and *Campylobacter*. Heat and chemical treatments were applied, alone or combined, on chicken skin surfaces inoculated with *Listeria innocua* and *Salmonella* Enteritidis. The chemical treatment uses lactic acid solutions, without any danger for human safety. Heat treatment involves steam. The aim of this study is to improve the knowledge of the decontamination mechanisms, and define a treatment domain allowing an efficient reduction of the bacterial load on the surface of carcasses, without affecting the product's sensorial properties.

Combined treatments can cumulate the advantages of heat and acid treatments. Steam allows an immediate decontamination of the product, but do not prevent risks of later bacterial growth. Acid treatment becomes really efficient during product's storage. It is thus possible to reach high decontamination levels, as 4 log for *Listeria innocua* and 3 log for *Salmonella* Enteritidis, without any modification of the aspect or the taste of the product.

Keywords: Decontamination, Poultry, Lactic Acid, Steam, Combined Treatment, *Listeria*, *Salmonella*.